AUTOLOGE STAMMZELLTRANSPLANTATION NACH HOCHDOSIERTER GANZKÖRPERBESTRAHLUNG BEI HUNDEN – EINFLUSS DER ZELLZAHL UND DES FRAKTIONIERUNGSSCHEMAS

Ulrich Bodenberger

1981

Aus dem Institut für Hämatologie, Abteilung für Immunologie
(Leiter: Prof. Dr. S. Thierfelder)
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung, Neuherberg

vorgelegt über das

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
(Lehrstuhl: Prof. Dr. D. Hegner)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. K. Tempel

AUTOLOGE STAMMZELLTRANSPLANTATION NACH HOCHDOSIERTER GANZKÖRPERBESTRAHLUNG BEI HUNDEN – EINFLUSS DER ZELLZAHL UND DES FRAKTIONIERUNGSSCHEMAS

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Ulrich Bodenberger
aus
Leverkusen

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. J. von Sandersleben
Referent:	Prof. Dr. K. Tempel
Korreferent:	Prof. Dr. M. Merkenschlager

Tag der Promotion: 24. Juli 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung ... 1

2. Schrifttum ... 2

2.1. Fraktionierung und Protrahierung der Bestrahlung ... 2

2.2. Erste Erfolge bei der Behebung von letalen Strahlenschäden durch Stammzellersatz und dessen Gefrierkonservierung ... 6

2.3. Reinfusion kryokonservierter hämopoetischer Zellen nach letaler Ganzkörperbestrahlung beim Hund ... 7

2.3.1. Knochenmarkzellen ... 7

2.3.2. Periphere Leukozyten ... 9

2.4. Überleben des Hundes nach Ganzkörperbestrahlung mit und ohne Transplantation frischen autologen Knochenmarks ... 10

3. Material und Methoden ... 12

3.1. Versuchstiere und Versuchsgruppen ... 12

3.2. Gewinnung hämopoetischer Zellen ... 13

3.2.1. Knochenmarkentnahme ... 13

3.2.2. Leukozytapherese ... 14

3.3. Gefrierkonservierung der hämopoetischen Zellen ... 15

3.4. Kulturen hämopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark ... 16

3.5. Ganzkörperbestrahlung und Dosimetrie ... 16

3.6. Auftauen, Zelldosisbestimmung und Reinfusion der hämopoetischen Zellen ... 18

3.7. Untersuchung und Behandlung der Versuchstiere ... 19

3.8. Laparoskopie und Autopsie ... 20

3.9. Auswertungskriterien und Statistik ... 21

4. Ergebnisse ... 23

4.1. Erholung der Hämopoese und Überlebenszeiten nach hochdosierter Ganzkörperbestrahlung und autologer Stammzellentransplantation ... 23

4.1.1. 1600 R Ganzkörperbestrahlung als Einzeldosis und 2400 R Ganzkörperbestrahlung fraktioniert ... 23

Seite

4.1.2. 2400 R Ganzkörperbestrahlung fraktioniert innerhalb einer Woche und Reinfusion kryokonservierter hämopoetischer Zellen graduierter Anzahl ... 25
4.1.2.1. Knochenmarkzellen ... 25
4.1.2.2. Periphere Leukozyten ... 31
4.1.3. 2400 R Ganzkörperbestrahlung unterschiedlicher Fraktionierung ... 35

4.2. Strahlenkrankheit und Todesursachen nach unterschiedlicher Bestrahlungskonditionierung zur autologen Stammzelltransplantation ... 37
4.2.1. Kontinuierliche Strahlenexposition ... 37
4.2.2. Ganzkörperbestrahlung unterschiedlicher Fraktionierung und Infusion autologer Knochenmarkzellen ausreichender Anzahl ... 38
4.2.2.1. Dreitägliche Bestrahlung ... 38
4.2.2.2. Zweitägliche und tägliche Bestrahlung ... 40
4.2.3. Ganzkörperbestrahlung gleichbleibender Fraktionierung und Reinfusion hämopoetischer Zellen reduzierter Anzahl ... 42

5. Diskussion ... 48

5.1. Hämopoetische Rekonstitution ... 48
5.1.1. Knochenmarkstroma ... 48
5.1.2. Anzahl mononukleärer Zellen und determinierter Stammzellen im Transplantat ... 49
5.1.2.1. Knochenmarkzellen ... 49
5.1.2.2. Periphere Leukozyten ... 52

5.2. Strahlenkrankheit ... 54
5.2.1. Akute gastrointestinale Toxizität ... 54
5.2.2. Infektionen und Blutungen ... 55
5.2.3. Chronische Veränderungen und Spätschäden ... 55

5.3. Bedeutung der tierexperimentellen autologen Stammzelltransplantation nach Ganzkörperbestrahlung ... 56

6. Zusammenfassung ... 59

Summary ... 62

7. Literaturverzeichnis ... 65

1. Einleitung

Die Transplantation hämopoetischer Stammzellen ermöglicht den Schutz des Empfängers vor dem hämatologischen Strahlentod nach einer Ganzkörperbestrahlung (GKB).

Vor allem Knochenmark (KM) und peripheres Blut enthalten Zellen mit blutbildender Potenz. Im Gegensatz zur KM-Aspiration ist bei der Sammlung von Stammzellen aus dem Blut keine Vollnarkose nötig. Die Gefrierkonservierung der Zellen für eine begrenzte Zeitdauer beeinträchtigt ihre hämopoetische Wirksamkeit nicht.

Bei der autologen Transplantation werden empfängereigene Zellen entnommen und nach der Bestrahlung reinjiziert. Die Gefahr immunologischer Komplikationen (Abstoßung und Transplantat-gegen-Wirt Reaktion) wie bei Transplantationen zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen besteht nicht.

Die autologe Stammzelltransplantation ermöglicht somit eine *myelosuppressive Radiotherapie* bei Patienten mit fortgeschrittenem Krebsleiden, die auf die konventionelle Therapie nicht mehr ansprechen.

Für eine vollständige Erholung der Hämopoese nach GKB ist die Infusion einer ausreichenden Menge pluripotenter Stammzellen erforderlich. Die vorliegende Arbeit untersucht im ersten Teil die Anzahl transplantierter KM-Zellen und peripherer Leukozyten, die für die Wiederherstellung der Hämopoese nach 2400 R (ca. 18 - 20 Gy)* fraktionierter Ganzkörperbestrahlung (FGKB) notwendig ist. Sie wird mit der in der Literatur angegebenen Menge verglichen, die für die Rekonstitution der Blutbildung nach niedrigen Einzeldosen erforderlich ist. Im zweiten Teil wird das Strahlensyndrom beim Hund nach unterschiedlicher Fraktionierung von 2400 R und Transplantation hämopoetischer Zellen untersucht. Zum Vergleich ist eine Versuchsgruppe Hunde mit 1600 R (ca. 12 - 14 Gy)* GKB als Einzeldosis und autologer Knochenmarktransplantation (AKMT) vorangestellt.

* Anmerkung: Anstelle der SI-Einheiten C kg^{-1} bzw. Gy werden vorliegend noch die alten Dosiseinheiten R bzw. rd verwendet, um den häufigen Bezug auf entsprechende Literaturstellen nicht zu erschweren.

2. Schrifttum

2.1. Fraktionierung und Protrahierung der Bestrahlung

Ionisierende Bestrahlung wirkt sich je nach Dosis verschieden auf den Säugetierorganismus aus. Ganzkörperbestrahlungen im Bereich von ca. 300 - 1200 R führen innerhalb von 5 Tagen bis 3 Wochen zum „Knochenmarktod" durch die Zerstörung der blutbildenden Elemente; Infektion und Hämorrhagien sind unmittelbare Todesursachen. Bestrahlungen von ungefähr 1200 - 15000 R bewirken den „gastrointestinalen Tod" durch Zerstörung des Epithels des Verdauungstraktes. Resorptionsstörungen, Flüssigkeits-, Eiweiß- und Elektrolytverlust ergänzen sich als Ursachen des nach 3 - 4 Tagen (Kurvenplateau) eintretenden Todes. Höhere Strahlendosen führen innerhalb von 48 Stunden zum akuten Tod durch irreversible Schädigung des Zentralnervensystems. Die beschriebenen Dosisbereiche resultieren in erster Linie aus Untersuchungen an der Maus bei einmaliger GKB mit Photonenstrahlen im therapeutischen Dosisleistungsbereich (BOND et al., 1965).

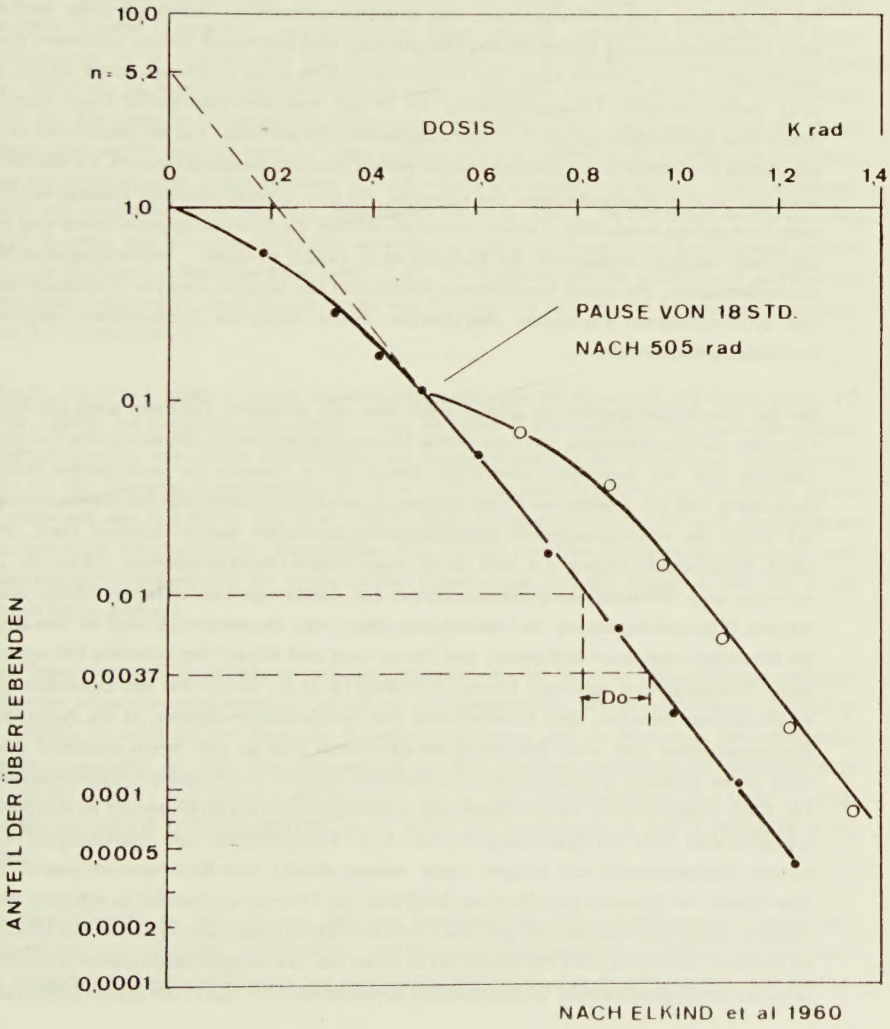
Die Hauptursache der meisten akuten Strahlenschäden ist die Inaktivierung proliferationsfähiger Zellen (Mitosehemmung, Zelltod). Für Säugetierzellen ergeben sich nach Bestrahlung mit locker ionisierenden Strahlen *in vitro* entsprechende Dosiseffektkurven, die in der halblogarithmischen Darstellung (Abb. 1) mit einer Neigung („Schulter") beginnen, bei höheren Dosen nimmt die Neigung zu (abnehmende Strahlenresistenz) und geht schließlich in einen konstanten Wert (Kurvengerade) über (PUCK et al., 1956). Charakterisiert sind solche typischen „Schulterkurven" durch die Extrapolationszahl n (Schnittpunkt der Verlängerung der Kurvengerade mit der Ordinate) und durch die Dosis D_0, durch die im geraden Kurvenverlauf der Anteil der jeweils noch überlebenden Zellen auf 37 % reduziert wird (ALPER et al., 1960).

Zellen, die durch die Bestrahlung nicht inaktiviert, aber subletal vorgeschädigt sind, können sich erholen und die höhere Kompensationsfähigkeit unbestrahlter Zellen wiedererlangen. Dadurch ergibt sich bei *fraktionierter* Bestrahlung mit einem Intervall von mehreren Stunden eine erneute Schulter (Abb. 1) in der Dosiswirkungskurve der 2.Dosisfraktion (ELKIND et al., 1960). Dieser Vorgang wiederholt sich bei jeder neuen Fraktion. Daraus folgt, daß die Wirkung einer gegebenen Gesamtdosis um so geringer wird, je stärker die Dosis in Einzelfraktionen unterteilt ist (ALPER et al., 1969). Bei Bestrahlungen mit niedriger Dosisleistung *(Protrahierung)* kann die Erholung auch unter der kontinuierlichen Strahlenexposition erfolgen; die Dosiswirkungskurve verläuft im allg. um so flacher, je geringer die Dosisleistung ist. Unterhalb einer gewissen Dosisleistung (ca. 0,1 rd / min) dürften nur noch die auf die irreversible Komponente zurückführenden Strahlenwirkungen den Verlauf der Dosiswirkungskurve bestimmen (HUG et al., 1966). Dünndarmepithelzellen haben eine vergleichsweise große Schulter, die Dosisleistung beeinflußt deshalb besonders

Abb. 1: Dosisleistungskurven für isolierte Säugetierzellen (chinesischer Hamster) in vitro:

• BEI EINMALIGER BESTRAHLUNG

○ BEI FRAKTIONIERTER BESTRAHLUNG (ERSTDOSIS 505 rad)



stark die Neigung ihrer Dosiseffektkurve (WITHERS et al., 1971).

Es ist aber auch möglich, daß ein Wirkungsoptimum der Bestrahlung auf proliferierendes Gewebe erst bei bestimmter Dosisleistung oder bei ihrer geeigneten Fraktionierung erreicht wird (HUG et al., 1966): Das kann zum einen seinen Grund darin haben, daß bei einem bestimmten Fraktionierungsplan in Abhängigkeit der Höhe der Einzeldosen, Pausendauer und Gesamtbestrahlungszeit ein größerer Teil proliferierender, also strahlenempfindlicher Zellen getroffen wird als bei einer Einzeitbestrahlung (innerhalb des Mitosezyklus sind bestimmte Phasen besonders strahlenempfindlich). Zum anderen kann eine Einzeitbestrahlung einen Proliferationsreiz setzen, indem einer vorübergehenden Teilungshemmung der in der strahlenempfindlichen Phase getroffenen Zellen eine Erholungsphase mit z.T. überschießenden Werten folgt. Die Mitoseaktivität der Zellpopulation kann dabei einen phasenförmigen Ablauf (Synchronisation) nehmen. Es resultiert eine zeitweise Strahlenempfindlichkeit des Gewebes, die eine optimal wirkende Dosisverteilung weiterer Bestrahlung ermöglicht. Für den zeitlichen Ablauf des Fraktionierungseffektes sind zellulär also zwei Vorgänge maßgebend, die ELKIND et al. (1967) in einem „Repair-Progession-Model" zusammenfaßten: die zuerst beschriebene *Restitution* der Schulter und die Progression der partiell synchronisierten Population überlebender Zellen durch die Zyklusphasen verschiedener Strahlenempfindlichkeit.

Bei der Ganzkörperbestrahlung spielen außer den rein zellulären Faktoren auch die Regenerationsrate, die Durchblutung, die hormonelle Versorgung und andere physiologische Faktoren des Gewebes und des Organismus eine Rolle. Davon ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit von Bedeutung, daß die Gewebe bei Fraktionierung in den bestrahlungsfreien Intervallen unterschiedlich durch die wiedereinsetzende Zellproliferation *regeneriert* werden können. Haut, Schleimhäute, blutbildende Organe u.a. sind durch einen jeweils charakteristischen Zyklus der Zellvermehrung und -differenzierung gekennzeichnet bei Ausgewogenheit zwischen Abbau und Neubildung (Fließgleichgewicht). Bei Bestrahlung dieser sog. Mausergewebe sind es also zusätzlich die Besonderheiten ihrer Zellkinetik, von denen Grad und Ablauf des Schadens bei unterschiedlicher Dosisverteilung abhängen können (CRONKITE et al., 1972): Bei den besonders strahlenempfindlichen Geweben, dem Knochenmark und lymphatischen System, ist die Ausprägung des Strahlenschadens und seine Spiegelung im peripheren Blut an sich schon bestimmt durch die einer jeden Zellreihe (Erythropoese, Granulopoese, Megakaryozytogenese) eigentümlichen Kinetik. Reife Granulozyten, Blutplättchen und Erythrozyten gelten im Gegensatz zu den peripheren Lymphozyten nicht als strahlenempfindlich. Aber Thrombozyten und Granulozyten mit ihren kurzen Lebensspannen von einigen Tagen müssen ständig vom Knochenmark ersetzt werden. Das Fehlen der Granulozyten führt zur Infektion, der Thrombozytenabfall zu erhöhter Blutungsneigung. Beim Dünndarmepithel geht die kontinuierliche Zellerneuerung (Dauer des Mitosezyklus ca. 36 Std.) von den LIEBERKÜHNschen Krypten aus. Die neugebildeten Zellen (Enteroblasten) wandern unter gleichzeitiger Differenzierung (Enterozyten) zur Spitze der Zotten (reife, resorptive

Epithelzellen), wo sie schließlich nach einer Lebenszeit von 3 - 5 Tagen in das Darmlumen abgeschilfert werden. Einzeitbestrahlungen mit Dosen über 1000 R führen bei zunächst ungestörtem Weiterwandern der Zellen infolge Mitosehemmung und Zelluntergang in den Krypten zur Entblößung der Darmwand; ausreichende Protrahierung oder kleinere Dosen bewirken nur eine Reduktion der Zellzahl (QUASTLER, 1956 / WITHERS et al. 1971).

Für die Dünndarmschleimhaut, das Knochenmark und andere normale (Haut, Knorpel) sowie maligne Gewebe (Lymphom, Leukämiezellen) kann man mit besonderen Methoden die Dosiseffektkurven *in vivo* bestimmen. Die älteste Testmethode ist die Milzkolonietechnik (TILL et al., 1961) für die Stammzellen des Knochenmarks. Sie besteht in der quantitativen Transplantation von KM-Zellen in mit letaler Ganzkörperdosis bestrahlte Mäuse. Die Regeneration der Hämopoese zeigt sich in der Milz nach 10 Tagen in Form von mit bloßem Auge erkennbaren Knötchen, die aus blutbildenden Zellen bestehen (CFU-S = Colony forming units-spleen). Jede Kolonie entsteht aus einer einzigen klonogenen Zelle (BECKER et al.,1963), die mit einem Anteil von etwa 0,01 % unter den Knochenmarkzellen vertreten ist und unter besonderen Bedingungen auch in vitro in Kolonien auswachsen kann (vergl. 2.2.). Die Kolonien werden gezählt und als Funktion der Dosis aufgetragen; die Kurve ist durch eine D_0 von 105 rd und eine Extrapolationsnummer von 2,5 charakterisiert.

Die D_0 für CFU-S bleibt in einem Dosisleistungsbereich von 0,5 R/min bis 270 R/min gleich (FU et al., 1975). Im Gegensatz dazu zeigen – wie angeführt – Darmepithelzellen sowie die meisten anderen Gewebe eine starke Abhängigkeit der Dosiswirkung von der zugehörigen Dosisleistung. Die D_0 der jejunalen Kryptenzellen ist 11mal größer bei einer Dosisrate von 0,5 R/min als bei Anwendung von 270 R/min (FU et al., 1975). Nach KOLB et al. (1979b) ist auch das Überleben pluripotenter hämopoetischer Stammzellen des Hundes und ihre Repopulationsfähigkeit nach Ganzkörperbestrahlung von der verabreichten Gesamtdosis, von der Dosisrate aber nur im geringen Maße abhängig.

Die Repopulationsfähigkeit hämopoetischer Zellen bedarf stimulierender Serumfaktoren und steht allgemein unter dem regulierenden Einfluß des strahlensensiblen „Microenvironments" (WOLF et al., 1968). So wird bei der Maus das Knochenmark*stroma*, das das Wachstum hämopoetischer Zellen unterstützt, bei einer Bestrahlungsdosis von 950 R schwer geschädigt (CHAMBERLIN et al., 1974). Die D_0 von Stromavorläuferzellen, die in vitro Fibroblastenkolonien bilden, beträgt bei Mäusen 220 R (FRIEDENSTEIN et al., 1976) und beim Hund ca. 400 R (WILSON et al., 1978).

Zusammenfassend ist anzunehmen, daß bei Verabreichung einer hochdosierten Ganzkörperbestrahlung zur möglichst vollständigen Inaktivierung hämopoetischen Gewebes bei gleichzeitig möglichst geringer Schädigung des Gastrointestinaltraktes ihre Fraktionierung und die Pro-

trahierung der Einzeldosen vorteilhaft sind. Andererseits ist zu erwarten, daß die hohe Gesamtdosis eine hämopoetische Rekonstitution durch autologe Stammzelltransplantation in ihrer Kinetik stark beeinflußt.

2.2. Erste Erfolge bei der Behebung von letalen Strahlenschäden durch Stammzellersatz und dessen Gefrierkonservierung

Schon Anfang des Jahrhunderts, nur 8 Jahre nach Entdeckung der Röntgenstrahlen, wies HEINEKE (1903) auf die Schädigung der Hämopoese als mögliche Todesursache nach Ganzkörperbestrahlung hin. Die erste klare Demonstration hämopoetischer Schutzwirkung gegen letale Bestrahlung gelang Ende der vierziger Jahre bei Mäusen (JACOBSON et al., 1949). Ihre Todesrate wurde durch Bleiabschirmung der *Milz* während der Strahlenexposition erheblich reduziert. Ein ähnlicher therapeutischer Effekt wurde durch Implantation autologen Milzgewebes und durch Injektion isologer Milzzellsuspensionen nach der Bestrahlung erreicht (JACOBSON et al., 1951). Auch an Mäusen sowie Meerschweinchen zeigten LORENZ et al. (1952) die Schutzwirkung parenteral verabreichter *Knochenmark*zellen nach Bestrahlung. CONGDON et al. (1956) beschrieben, daß tödlich bestrahlte Mäuse durch *Blut*transfusionen, die von isologen Spendern mit extremer Leukozytose gewonnen worden waren, überlebten.

Anfangs nahm man an, daß *humorale* Faktoren in der Milz- bzw. Knochenmarksuspension für die Wiedererholung der blutbildenden Gewebe verantwortlich seien (COLE et al., 1953). Mitte der fünfziger Jahre wurde jedoch durch immunologischen (LINDSLEY et al., 1955),zytogenetischen (FORD et al., 1956) und histochemischen (NOWELL et al., 1956) Nachweis von sich teilenden Spenderzellen im Empfänger bewiesen, daß die Schutzwirkung des – transplantierten – Zellmaterials auf der *Proliferation* im Empfänger beruht. Schon vorher war auf die Notwendigkeit zellschonender Methoden beim Einfrieren hämopoetischen Gewebes hingewiesen worden (BARNES et al., 1955).

Die Regeneration des durch die GKB aplastischen Knochenmarks wird letztlich durch die *pluripotenten* Stammzellen im Transplantat bewirkt. Man vesteht darunter solche Zellen, die für die ständige Regeneration aller Blutzellsysteme verantwortlich sind bei gleichzeitiger Selbstreproduktion. Hämopoetische Stammzellen im Blut können als wandernde Stammzellen aufgefaßt werden, sie wurden bereits von MAXIMOW (1909) unter den „mononukleären" Leukozyten vermutet. Während die in der Milz Kolonien bildende klonogene Zelle (TILL et al., 1961 / vergl. 2.1.) eine pluripotente Stammzelle ist (Mischung von Erythropoese mit Granulo- und Thrombopoese in den Milzknötchen), werden die in vitro Kolonien bildenden Zellen für *determinierte*

Stammzellen mit Differenzierungsmöglichkeit in nur eine Reihe gehalten. PLUZNIK et al. (1965) sowie BRADLEY et al. (1966) gelang bei der Maus zuerst die Züchtung von hämopoetischen Stammzelllen in vitro, die in semisolidem Agar zu granulo- und monozytären Kolonien heranwachsen (vergl. 3.4.). Die Kultur von Stammzellen in semisolidem Agar gelang auch in Form erythropoetischer (STEPHENSON et al., 1971), megakaryozytärer (METCALF et al., 1975) und lymphozytärer (WILSON et al., 1976) Kolonien. Methoden zu Kultur multipotenter hämopoetischer Stammzellen befinden sich noch in der Entwicklung (DEXTER et al., 1980).

Bei der *Kryokonservierung* hämopoetischer Stammzellen verhindert eine optimale Abkühlrate nach Zusatz eines Gefrierschutzmittels ihre Schädigung durch intrazelluäre Eisbildung. Die Einfriertechnik von BARNES benutzten SCHWARTZ et al. (1957) zur Gefrierkonservierung von Mäuseknochenmark für 7 bis 8 Tage bei -70°C. 15 % Glycerol diente als Gefrierprotektivum, die Einfrierrate bis -15°C betrug 1°C/min, bis -70°C 10°C/min. Die Transplantation nach 900 R GKB erbrachte eine gleich hohe 30 Tage-Überlebensrate wie die Anwendung frischen Knochenmarks (8 von 9 Tieren), während unbehandelte Kontrollen innerhalb von 14 Tagen starben. Unter gleichen Einfrier- und Bestrahlungsbedingungen erreichten PORTER et al. (1958) beim Kaninchen ein Anwachsen des Knochenmarks, während schneller oder schockartig eingefrorenes KM unwirksam blieb. ASHWOOD-SMITH (1961) verwandte Dimethylsulfoxid (DMSO) als 15 %igen Zusatz zum Einfrieren von Mäuseknochenmark bei langsamem Temperaturabfall bis -79°C. Die Tiere zeigten nach 1000 R GKB und KM-Reinfusion eine schnellere Erholung der peripheren Blutwerte als ansonsten gleichbehandelte Empfänger, die glycerolkonserviertes KM erhalten hatten.

2.3. Reinfusion kryokonservierter hämopoetischer Zellen nach letaler Ganzkörperbestrahlung beim Hund

2.3.1. Knochenmarkzellen

Auch beim Hund verwendete man zunächst 15 % Glycerol als Kryoprotektivum (Tab. 1) und erreichte eine hämopoetische Erholung letal bestrahlter Tiere durch Infusion autologen Knochenmarks selbst nach Lagerungszeiten bis zu 14 Monaten (THOMAS et al., 1962). Dabei betrug die transplantierte Zellzahl mindestens 200 x 10^7 je Hund; die Hälfte davon reichte nicht aus (MANNICK et al., 1960a). CAVINS et al. (1962) benutzten DMSO in 5 bis 15 %iger Konzentration, wobei Hunde mit einer Zellzahl von mehr als 160 x 10^7 je Hund (Gewicht 5-15 kg) eine vollständige blutbildende Rekonstitution aufwiesen, aber nur 2 von 5 Hunden mit 110-145x10^7 KM-Zellen.

Tab. 1: Transplantation *gefrierkonservierten* autologen Knochenmarks nach letaler Ganzkörperbestrahlung beim Hund

Dosis und Dosisrate	Temperatur Lagerungszeit	Gefrierschutz	Zellzahlx10^7 (* korrigiert)	30 Tage-Überleber / Gesamt	AUTOR Versuchstier
1000 R	- 79°C : 1-5 Tage	15% Glycerol	260- 400	5/5	MANNICK et al., 1960a
(1,8 R/min)	" : 1u.5 Tage	"	100, 110	0/2	Beagle (5-18 Monate)
1000 R	- 80°C : 1 Woche	15 % Glycerol	250	1/1	THOMAS et al., 1962
(4 R/min)	- 180°C : "	"	240	1/1	Beagle
	- 80°C : 14 Monate	"	410	1/1	
	- 180°C : "	"	420	1/1	
1200 R	- 80°C : 8-30 Tage	10 % DMSO	160- 520	9/9	CAVINS et al., 1962
(5,5 R/min)	" : 9-18 Tage	5 % "	110	2/3	Bastarde und Beagle (5-15 kg)
	" : 13 Tage	15 % "	311	1/1	
	" : 8u.9 Tage	15 % "	111, 145	0/2	
750 rd	?	7,5% DMSO	5,0/kg	2/2	VRIESENDORP et al., 1976
(18 rd/min)					
1000 rd	- 140°C : 2 Monate	10 % DMSO	* 5,0/kg	6/6	GORIN et al., 1978
(9 rd/min)	" : "	"	* 2,5/kg	6/8	Foxhound
	" : "	"	* 1,0/kg	2/3	
	" : 5 Monate	"	* 5,0/kg	4/4	
	" : "	"	* 2,5/kg	3/7	
1000 rd	- 140°C : 9 Monate	10 % DMSO	* 5,0/kg	7/10	APPELBAUM et al., 1978
(9 rd/min)	" : 12 Monate	"	* "	6/18	Foxhound und Beagle
	" : 18 Monate	"	* "	0/ 5	

Alle Versuchsreihen wurden mit ^{60}Co-Bestrahlung (bilateral) durchgeführt außer VRIESENDORP et al. (keine Angabe)
* Reduziert um den Anteil nukleärer Blutzellen (vergl. 3.2.1.)

Eine erste Angabe über Zellzahl pro Kilogramm Körpergewicht machten VRIESENDORP et al. (1976), die Knochenmark zweier Hunde mit 7,5 % DMSO einfroren und 5,0x10^7 kernhaltige KM-Zellen/kg KG nach einer Ganzkörperbestrahlung von 750 rd reinfundierten. Der Wiederanstieg der peripheren Leukozyten auf 1000/mm^3 erfolgte am 14.Tag nach Transplantation (p.TP). Mit der gleichen *(korrigierten)* Anzahl der KM-Zellen/kg KG zeigten in einer weiteren Studie (GORIN et al., 1978) 10 Hunde eine vollständige hämopoetische Erholung nach 1000 rd GKB, 9 von 15 Hunden mit 2,5 x 10^7 und 2 von 3 Hunden mit 1,0 x 10^7/kg KG. Die zugehörigen Lagerungszeiten des Knochenmarks betrugen 2 - 5 Monate in der Dampfphase flüssigen Stickstoffs (ca. -140°C). Die Überlebensraten wurden jedoch nach längerer Kryokonservierung stark reduziert: um 30 % bei 9 Monaten, um 70 % bei 12 Monaten und um 100 % bei 18 Monaten Lagerungszeit (APPELBAUM et al., 1978).

2.3.2 Periphere Leukozyten

Bisherige autologe Transplantationen gefrierkonservierten „Buffycoats" (BC / vergl. 3.2.2.) nach Ganzkörperbestrahlung bei Hunden wurden mit einer Einzeldosis von 1200 R, Dosisraten zwischen 4 und 10 R/min durchgeführt (Tab. 2). 30 Tage-Überleber sind nach Reinfusion von

Tab. 2: Transplantation gefrierkonservierter autologer Leukozyten nach letaler Ganzkörperbestrahlung beim Hund

Strahlen-Quelle	Dosis (Dosisrate)	Temperatur (Lagerungszeit)	Zellzahl x 10^7 (*mononukleäre)	30 Tage - Überleber/ Gesamt	AUTOR Versuchstier
^{60}Co bilateral	1200 R (4,5 R/min)	- 80°C (3 Tage - 6 Wochen)	210- 600 900- 2000	0/4 3/5	CAVINS et al., 1964 Bastarde (7-15 kg)
^{60}Co bilateral	1200 R (9,2 R/min)	- 80°C (2 - 3 Wochen)	* 500- 700 * 1060, 2430	2/3 0/2	STORB et al., 1968 Beagle (7 - 15 kg)
Röntgenröhre 300 Kv/12mA	1200 R (8 R/min)	- 140°C - - 196°C ?	* 750 * 1050	N.G./4 N.G./1	FLIEDNER et al., 1977 Beagle (12 - 17 kg)
Röntgenröhre 300 Kvp	1200 R (7,2 R/min)	- 196°C (4 Wochen - 18 Monate)	* 125- 163/kg * 32- 56/kg	4/4 3/4	NOTHDURFT et al., 1977 Beagle (13 - 20 kg)
^{60}Co bilateral	1000 rd (9 rd/min)	- 120°C - - 160°C (bis 2 Monate)	* > 60/kg	80%	APPELBAUM, 1979

In allen Versuchsreihen wurde 10 % DMSO als Kryoprotektivum benutzt; N.G. = nicht getestet; ? Keine Angaben

900 - 2000x10^7 *Gesamt*leukozyten (CAVINS et al., 1964) bzw. von 500 - 700x10^7 *mononukleären* BC-Zellen (STORB et al., 1968) je Hund (KG 7-15 kg) beschrieben. FLIEDNER et al. (1977) transplantierten 750x10^7 und 1050x10^7 aufgetaute mononukleäre Leukozyten bei 5 Hunden (KG 12-17 kg). Die Tiere wurden am 10.Tag p.TP getötet. Ihr Knochenmark wies in allen Fällen eine eindeutige Repopulation auf.

Gewichtsbezogene Angaben folgten: Mit über 60x10^7 mononukleären Leukozyten/kg KG (APPELBAUM et al., 1979) wurde in 80 % der Fälle eine vollständige blutbildende Rekonstitution erreicht, wobei die Kryokonservierungsdauer bis zu 2 Monate bei - 120 bis - 160°C betrug. Annähernd wird dieses Ergebnis allerdings auch bei Transplantation von 32 - 56x10^7 mononukleären BC-Zellen/kg KG beschrieben, zugehörige Lagerungszeit: 1 bis 18 Monate bei - 196°C (NOTHDURFT et al., 1977).

2.4. Überleben des Hundes nach Ganzkörperbestrahlung mit und ohne Transplantation frischen autologen Knochenmarks

Die Schwellendosen für den Knochenmark- bzw. gastrointestinalen Tod variieren je nach Strahlenart, nach angewandter zeitlicher Verteilung der Bestrahlung sowie von Spezies zu Spezies (vergl. 2.1.). Für den Hund wurde bei beidseitiger Gammabestrahlung (^{60}Co, Dosisleistung 6 R/min) eine $LD_{50/30\ Tage}$ von 350 R ermittelt mit 18 Tagen durchschnittlicher Überlebenszeit; die $LD_{100/30\ Tage}$ liegt über 420 R (SHIVELY et al., 1958/1961). Die $LD_{50/5\ Tage}$ ist mit 1300 R GKB (ohne Dosisleistung) für den Hund beschrieben (BOND et al., 1965). Nach einer 3000 R - ^{60}Co - GKB (HANDFORD, 1960) starben alle Hunde innerhalb von 3 - 4 Tagen ($LD_{100/\ 88\ h}$/16 Hunde). Die Überlebenszeiten von Hunden bei bisher durchgeführten autologen Transplantationen frischen Knochenmarks nach GKB mit locker ionisierenden Strahlen einschließlich unbehandelter Kontrollen (ohne AKMT) geben weitere Aufschlüsse (Tab. 3).

Tab. 3: Überleben beim Hund nach Ganzkörperbestrahlung und Transplantation autologen *frischen* Knochenmarks

Dosis (Röntgen)	Dosisrate (R / min)	Zellzahl x 10^7 (* korrigiert)	7/30 Tage Überleber – Gesamt	AUTOR Bestrahlung / Versuchstier
400	11	180	8/8 – 8	ALPEN et al., 1958
400	"	-	8/1 – 8	Röntgenröhre 250 Kvp
600	"	200	3/3 – 3	Bastarde 11-15 kg (Rotation
600	"	100	1/0 – 2	um die Längsachse)
600	"	-	2/0 – 2	
400	55	26 - 64	8/7 – 8	SULIVAN et al., 1959
400	"	-	6/1 – 6	Röntgenröhre 250 Kvp unilateral
450	"	9 - 100	4/0 – 4	Bastarde 5- ? kg
450	"	-	10/0 – 11	
550	"	-	3/0 – 4	
600	"	1 - 5	0/0 – 2	
600	"	-	6/0 – 12	
400	9,2	* 360	1/1 – 1	THOMAS et al., 1970a
400	"	-	5/1 – 5	^{60}Co bilateral
500	"	* 610	1/1 – 1	Beagle u. „Hound Dogs"
500	"	-	5/0 – 5	7-15 kg u. 1/2 - 2 Jahre
600	"	* 460	1/1 – 1	
600	"	-	5/0 – 5	
350 rd		-	3/3 – 3	VRIESENDORP et al., 1976
750 rd	?	5,0 /kg	4/4 – 4	?
750 rd		-	?/0 – 6	
600	5	140 - 190	2/2 – 2	MANNICK et al., 1960b
800	"	320	1/1 – 1	Röntgenröhre 250 Kvp
2 x 400	"	250	1/1 – 1	Beagle 6-8 kg (Rotation)

Tab. 3 (Fortsetzung)

Dosis (Röntgen)	Dosisrate (R / min)	Zellzahl x 10^7 (* korrigiert)	7/30 Tage Überleber – Gesamt	AUTOR Bestrahlung / Versuchstier
1000 rd	9	* 10,0 /kg	7/7 – 7	GORIN et al., 1978
1000 "	"	* 5,0 /kg	3/3 – 3	^{60}Co bilateral
1000 "	"	* 2,5 /kg	4/2 – 4	Foxhound
1000 "	"	* 1,0 /kg	4/2 – 4	
864	18	330 - 350	2/2 – 2	HAGER et al., 1961
880 - 1270	1,8	189 - 468	10/10 – 10	^{60}Co bilateral
1800	5	210 - 260	3/3 – 3	Beagle 6 - 12 Monate
3 x 600	2	?	2/0 – 2	HAGER et al., 1963
1800	18	"	0/0 – 1	^{60}Co bilateral
2400	18		0/0 – 1	Beagle 7-10 kg
400	5,5	-	6/5 – 6	KOLB et al., 1979b
1600	5,5	* 10 - 30 /kg	4/4 – 4	^{60}Co bilateral
400	55	-	6/1 – 6	Beagle 12-16 kg
1600	55	* 10 - 30 /kg	0/0 – 4	
2400	5,5	o Geschwister-KM	4/4 – 7	
2400	0,5	o Geschwister-KM	5/5 – 8	

- Kontrolltiere (ohne AKMT) ? keine Angaben o allogene KMT / vergl. Text (2.4.) * vergl. 3.2.1.

Dabei ist jedoch die anderweitig substituierende Therapie der Kontrolltiere (Flüssigkeitsersatz, Antibiotika usw.) im folgenden zu berücksichtigen.

Alle Autoren wendeten Röntgen- (250 Kvp) oder Gammastrahlen (^{60}Co) an, dabei ist das Überleben einer 400 R GKB ohne AKMT nach den Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen möglich. Betrug die zugehörige Dosisleistung 55 R/min starben 5 von 6 Hunden sowohl bei unilateraler Röntgenbestrahlung (SULLIVAN et al., 1959) als auch bei bilateraler ^{60} Co-Bestrahlung; bei 5,5 R/min nur einer von 6 Hunden (KOLB et al., 1979b). 500 R und 600 R GKB (THOMAS et al., 1970a), Dosisleistung 9,2 R/min, überlebten alle Hunde mit AKMT, die Kontrollen (10 Hunde) starben nach 13 Tagen durchschnittlicher Überlebenszeit an der Knochenmarkaplasie – gastrointestinale Todesursachen sind nicht aufgeführt.

Bei der weiteren Steigerung der Bestrahlungsdosis bis 800 R (MANNICK et al., 1960b), 1000 rd (GORIN et al., 1978), 1600 R(KOLB et al., 1979b) und 1800 R (HAGER et al., 1961) mit unterschiedlichen Dosisraten zwischen 5 R/min und 9 rd/min ist das Überleben aller Hunde bei ausreichender Anzahl reinfundierter KM-Zellen beschrieben. Dabei kamen GORIN et al. in einer Zelldosisstudie zu etwa gleichen Ergebnissen wie mit kryokonservierten Transplantaten (vergl. 2.3.1.). Wurde die 1600 R GKB mit einer Dosisleistung von 55 R/min durchgeführt, starben die Tiere innerhalb von 4 - 6 Tagen an schwerer Enterocolitis. Nach 2400 R GKB, Dosisrate 5,5 R/min, und KM von histokompatiblen Geschwistern (hinsichtlich der akuten Strahlentoxizität der AKMT vergleichbar) überlebten 4 von 7 Hunden die akute gastrointestinale Toxizität (KOLB et al., 1979b) - eine weitere Protrahierung (0,5 R/min) erhöhte die Überlebensrate nicht.

3. Material und Methoden

3.1. Versuchstiere und Versuchsgruppen

Die Untersuchungen wurden an 61 Hunden aus der Zucht der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH (GSF) in München-Neuherberg durchgeführt. 57 *Beagle* und 4 *Bastard*hunde (Kreuzung Beagle x Bay. Gebirgsschweißhund), 38 Rüden und 23 Hündinnen wogen zu Versuchsbeginn durchschnittlich 13,2 kg (Bereich 8,2 - 18,4 kg KG) und waren im Mittel 1 1/2 Jahre alt (1/2 - 3 Jahre). Sie waren gesund und regelmäßig entwurmt sowie gegen Staupe, Hepatitis contagiosa canis und Leptospirose geimpft worden.

Als Tag 0 wird der Tag der Transplantation (Reinfusion der hämopoetischen Zellen) bezeichnet. Davorliegende Tage (Bestrahlungszeitraum) sind mit einem Minus gekennzeichnet. Es wurden 4 *Gruppen* (Tab. 4 – ohne Gruppe A) untersucht:

Gruppe A: Transplantation frischen autologen Knochenmarks nach 1600 R GKB als Einzeldosis mit einer Dosisleistung von 5,5 R/min - 6 Hunde

Gruppe B: Reinfusion kryokonservierter KM-Zellen unterschiedlicher Anzahl nach 2 400 R GKB fraktioniert - 32 Hunde:
Tag -7 und -4: 600 R (0,5 R/min), Tag -1: 1200 R (5,5 R/min)

Gruppe C: Infusion kryokonservierter autologer Blutleukozyten unterschiedlicher Anzahl nach FGKB wie in Gruppe B - 11 Hunde

Gruppe D: Transplantation gefrierkonservierten autologen KM nach 2400 R GKB unterschiedlicher Fraktionierung und Protrahierung - 12 Hunde:
D_1: Tag -5 und -3 : 600 R(0,5 R/min), Tag -1 : 1200 R (5,5 R/min)
D_2: Tag -5 und -3 : 600 R (5,5 R/min), Tag -1 : 1200 R (5,5 R/min)
D_3: Tag -3 und -2 : 600 R (5,5 R/min), Tag -1 : 1200 R (5,5 R/min).

Tab. 4: Fraktionierung und Protrahierung der 2400 R-Ganzkörperbestrahlung

3.2. Gewinnung hämopoetischer Zellen

3.2.1. Knochenmarkentnahme

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden die Hunde nach Abnahme einer Blutprobe (I) zur Zählung durch intravenöse Injektion von Pentobarbital Natrium (Nembutal®) in Vollnarkose versetzt. Die KM-Aspiration erfolgte aus den beiden Oberarm- und Oberschenkelknochen sowie aus beiden Beckenkämmen. Für die langen Röhrenknochen wurden Aspirationsnadeln spezieller Herstellung (Fa. Stöckert/München) verwendet, für die Crista ilica Rosenthal-Nadeln 16 G (Fa. Becton-Dickinson/Heidelberg). Nach Einstich in den Sulcus intertubercularis humeri bzw. Fossa trochanterica femoris wurde die Nadel bis zum distalen Ende des Cavum medullare vorgebohrt. Der Mandrin wurde herausgezogen und der Nadelgewindeansatz mit einer 50 ml-Luer Lock Spritze (Fa. Becton-Dickinson) zur Aspiration verschraubt. Nadel und Spritze waren vorher mit heparinisiertem (5000 I.E. auf 100 ml) Medium TC 199 (Fa. Bio-Cult/Gernlinden) durchspült worden. Bei der Aspiration (Aufrechterhaltung eines Vakuums durch angezogenen Spritzenstempel) ist unnötig große *Blutbeimengung* durch ständige Rotation und langsames Zurückziehen der Nadel vermeidbar (THOMAS et al.,1970b). Die Beckenkammaspiration wurde an 3 bis 4 Stellen je Seite ausgeführt; sie ergibt besonders zellreiches Knochenmark (CALVO et al., 1975). Die gewonnene KM-Menge von ca. 200 - 250 ml wurde mit 25-40 ml Medium als Nährlösung in silikonisierten Stahlbechern gesammelt und über zwei rostfreie Stahlfilter mit Maschenweiten von 0,3 und 0,2 mm gefiltert. Anschließend wurde die Knochenmarksuspension zu je 50 ml-Portionen auf 5 bis 6 600 ml-Blutbeutel (Fa. Fenwal-Travenol/München) verteilt, gut gemischt und je Beutel eine weitere Probe (II) zur Zählung entnommen.

Zur Ermittlung der Anzahl mononukleärer Knochenmarkzellen (N) je 50 ml KM-Blut-Zellsuspension, wurden – nach Zählung kernhaltiger Zellen und Differntialblutbild der Proben I und II – die im vergleichbarem Volumen *Blut* enthaltenen mononukleären Zellen *abgezogen* (modifiziert nach THOMAS et al., 1970b):

I. Peripheres Blut
   a. mononukleäre Leukozyten pro mm^3
   b. Suspensionsvolumenanteil *höchstens:* 50 ml abzüglich Mediumanteil

II. KM-Blut-Zellsuspension
   a. mononukleäre Zellen pro mm^3
   b. Volumen: 50 ml

$\Rightarrow N = (IIa \times IIb) - (Ia \times Ib)$

Angaben über die Anzahl transplantierter Knochenmarkzellen in vorliegenden Untersuchungen stellen also Mindestmengen dar. Als „mononukleär" wurden alle kernhaltigen Zellen außer segment- und stabkernige aufgefaßt. Die *korrigierte* Zellzahl (N) betrug 83% ± 9 % (Mittelwert ± SD) der Gesamtanzahl nukleärer Knochenmarkzellen im Transplantat.

3.2.2. Leukozytapherese

Die Leukapherese (Kurzform von Leukozytapherese) ist ein Verfahren, um Leukozyten aus dem Blut abzutrennen (BIERMANN et al., 1961). Dazu wurde den Hunden ein arterio-venöser *Shunt* (Kurz- oder Nebenschluß) zwischen A. carotis communis und der V.jugularis eingesetzt. Der Shunt bestand aus zwei heparin durchspülten Silikonschläuchen (ø 5 mm), in die an einem Ende ein Teflonschlauchstückchen (ø 3,8 mm) eingeschoben war. Der Hund wurde in Allgemeinnarkose in Rückenlage mit Nackenrolle auf dem Operationstisch ausgebunden. Nach einem 10 - 15 cm langen ventro-medianen Halshautschnitt wurde das Gewebe mit Hilfe der COOPERschen Schere direkt unter dem Hautmuskel nach lateral stumpf durchtrennt zur Freilegung der V.jugularis. Auf der anderen Seite erreicht man die A.carotis communis durch stumpfes Vorgehen zwischen M.sternomandibularis und den Mm.sternothyreoideus et sternohyoideus (BERGE et al., 1969). Die Gefäße wurden cranial abgebunden, caudal mit einer DIEFFENBACH-Gefäßklemme versehen und dazwischen mit einer Gefäßschere zur Einführung der Teflonschlauchstückchen aufgeschlitzt. Letztere wurden in die Gefäße eingebunden, die Silikonschläuche durch Schlitze von Haut und Unterhautgewebe in der Regio cervicalis lateralis geführt und mit einem dritten Teflonschlauchstück äußerlich verbunden. Nach Entfernung der Gefäßklemmen und eingehender Kontrolle der Gefäßnähte wurde die mediane Inzision durch fortlaufende Naht geschlossen und der äußerliche Shuntbogen zur Versteifung auf Pappkarton verklebt, um gerinnungsfördernde Abknickungen zu vermeiden. Das Operationsgebiet wurde mit Kompressen, einem zirkulären Mullbindenverband um den Hals und mit einer Pappkartonrolle darüber zum Schutz vor Beschädigungen versehen.

Zur *Gewinnung der Leukozyten* wurde der Shunt am nächsten Tag am Verbindungsschlauchstück geöffnet, aus dem arteriellen Schenkel Blut entnommen und gleichzeitig in den venösen Schenkel Ringerlösung DAB 7 zur Volumensubstitution infundiert. Die Blutentnahme betrug je nach Gewicht des Hundes 300 - 500 ml, die auf heparinisierte 50 ml-Gläser mit Schraubverschluß verteilt und in einer „PR 6000 International"-Zentrifuge für 15 Minuten bei 2 700 U/min (1200 g) zentrifugiert wurden (RIEDER et al., 1978). Der „Buffycoat" (BC), die leukozytenreiche Schicht zwischen Erythrozyten und Plasma, ähnlich einer Speckhaut, wurde mit einer stumpfen Kanüle abgehebert, Erythrozytenschicht und Plasma wieder vermischt und parallel zur zweiten Blutentnahme („2.Lauf") zurückgegeben. Pro Tag wurden 3 bis 4 Läufe durchgeführt.

Der gesammelte BC, noch Plasma und Erythrozyten enthaltend, wurde nochmals zentrifugiert (1200g/15 min) und die nun wesentlich dickere „Speckhaut" erneut abgehebert, um ein Leukozytenkonzentrat möglichst kleinen Volumens zu erhalten. Die gewonnene Menge pro Tag betrug durchschnittlich 6,3 x 10^9 Leukozyten (Bereich 2,1 - 11,0 x 10^9) bei einem mittleren Volumen von 42,5 ml (15 - 80 ml) und wurde zu 25 ml-Portionen auf 300 ml-Blutbeutel (Fa. Fenwal-Travenol/München) verteilt.

Die Sammlung möglichst vieler Leukozyten war *begrenzt* durch die Haltbarkeit des Shunts (Undichtigkeiten, Blutungen, Gerinnungsvorgänge, Eiterung) sowie durch den sinkenden Hämatokrit des Spenders. Er mußte nach durchschnittlich 4 Tagen (2 - 12 Tagen) abgebunden werden. Deshalb war es bei einigen Hunden nach einer ausreichenden Erholungsphase nötig, einen zweiten Shunt der verbliebenen Gefäße zur erneuten Sammlung weißer Blutzellen zu legen. Der Anteil mononukleärer Leukozyten wurde im Differentialblutbild bestimmt.

3.3. Gefrierkonservierung der hämopoetischen Zellen

Die Kryokonservierung der hämopoetischen Zellen wurde in Anlehnung an die von BUCKNER et al. (1970) und SCHÄFER et al. (1975) beschriebenen Methoden durchgeführt. Als Gefrierschutzmittel diente Dimethylsulfoxid (Fa. Serva/Heidelberg). Es wurde als 20 %ige DMSO-TC199 Medium-Lösung angesetzt und auf Kühlschranktemperatur (+4°C) gebracht.

Das *Knochenmark* wurde zunächst in die Gefrierkammer einer Flüssigstickstoff Gefriereinheit (control rate freezer; Fa. Union Carbide/Düsseldorf) von Raumtemperatur auf +4°C mit einer kontrollierten Gefrierrate von 1°C/min abgekühlt. Anschließend wurde ihm bei gleichbleibender Temperatur die Gefrierschutzlösung gleichen Volumens – tropfenweise, dann zunehmend schneller – über 2 Minuten unter ständigem Schütteln des Blutbeutels hinzugefügt (resultierende DMSO-Konzentration: 10 %). Die sich ergebende Beutelfüllung von 100 ml (vergl. 3.2.1.) erbrachte nach Einspannen zwischen vorgekühlten Kupferplatten eine Schichtdicke von 5 - 7 mm. Das Gefriergut wurde wieder in die Kammer gegeben und der Einfriervorgang fortgesetzt:

+	4°C	bis	- 20°C	mit	1°C/min
-	20°C	bis	- 40°C	mit	2°C/min
-	40°C	bis	- 80°C	mit	4°C/min

Der *eutektische* Punkt (Kristallisationspunkt, bei dem durch die Kristallbildung Wärme frei wird)

lag zwischen -8°C und -12°C. Der Phasenwechsel war nach 2 - 3 Minuten bei einer vorübergehend vielfach verstärkten Flüssigstickstoffzufuhr (Kammertemperatur bis ca. - 50°C) vollzogen. Nach Beendigung des Einfrierprogramms wurden die Kupferplatten möglichst schnell wieder abgenommen,und die Beutel bei einer endgültigen Konservierungstemperatur von -120°C bis -160°C in der Dampfphase eines Flüssigstickstofftanks gelagert. Die durchschnittliche Lagerungszeit betrug 8 Wochen (Bereich 2 - 14 Wochen) für Gruppe B, 9 1/2 Wochen (2 - 25 Wochen) für Gruppe D.

Der Einfrierprozeß für die *Leukozyten* erfolgte in gleicher Weise, wobei die Gefrierschutzlösung gleichen Volumens außer 20 % DMSO noch 20 % Plasma enthielt. Die Blutbeutelfüllung von 50 ml (vergl. 3.2.2.) ergab zwischen den Kupferplatten die gleiche,eine gleichmäßige Abkühlung gewährleistende Schichtdicke von höchstens 7 mm. Die Lagerungszeit betrug im Mittel 13 1/2 Wochen (6 - 26 Wochen), bei 4 Hunden für eine zweite BC-Sammlung 43 1/2 Wochen (30 - 52 Wochen).

3.4. Kulturen hämopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark

Vom Knochenmark wurden 0,75 ml-Proben aus jedem Blutbeutel in 2 ml-Plastikröhrchen (Fa. Nunc/Wiesbaden) unter Zusatz gleicher Menge 20 %igen DMSO-TC199 Mediums miteingefroren (vergl. 3.3.). Sie dienten zur späteren Ermittlung von CFU_c-Werten (*C*olony *f*orming *u*nits in *c*ulture).

Dabei handelt es sich um eine Kulturmethode menschlicher hämopoetischer Stammzellen in semisolidem Agar (PIKE et al., 1970), die für die Granulopoese und Monozytopoese determiniert sind (vergl. 2.2.). Sie wurde in unserer Abteilung von Herrn Dr. B. NETZEL für den Hund adaptiert. Nach Auftauen der Proben (vergl. 3.6.) wurden mit Ficoll-Hypaque (Fa. Serva/Heidelberg) die mononukleären KM Zellen separiert, zweimal gewaschen und 1 x 10^5 Zellen in semisolidem Agar (0,3 %) ausgesät. Als Quelle *K*olonien *s*timulierender *A*ktivität (CSA) wurden 20 % Serum eines Hundes hinzugefügt, der mit Dimethylmyleran (DMM) behandelt und 10 Tage später entblutet worden war. Kolonien, definiert als Gruppen von mindestens 50 Zellen, wurden nach einer Kulturzeit von 8 Tagen ausgezählt. Sie enthielten Granulozyten mit oder ohne Monozyten.

CFU_c-Werte wurden für Hunde der Versuchsgruppe B ermittelt.

3.5. Ganzkörperbestrahlung und Dosimetrie

Die Bestrahlungsanlage besteht aus zwei gegenüberliegenden ^{60}Kobaltquellen (Gamma Beam 150 der Fa. Atomic Energy of Canada Ltd.), von denen eine, über Schienen beweglich, Abstands-

einstellungen zwischen 1m und 11m erlaubt. Bei einer Quellengröße von 53,3 mm Höhe und 22 mm Breite betrug ihre Aktivität im Dezember 1976 2,4 kCi. Der Öffnungswinkel der Quellenfenster beträgt 45^{o} nach allen Seiten.

Die Hunde wurden zur *Bestrahlung* in einen Holzstrebenkäfig gesperrt mit Innenmaßen von 44 cm Höhe und 55 x 97 cm Grundfläche, die als Spaltenboden mit darunterliegender Kotwanne das Tier vor Verunreinigungen bewahrte sowie Bewegungsspielraum ließ. Der Käfig wurde in die Mitte zwischen den ^{60}Co-Quellen auf einen höhenverstellbaren Operationstisch (Fa. Hauptner/Solingen) gestellt. Entsprechend der gewünschten Dosisleistung in Luft wurde ein bestimmter Quellen-Käfigmitte Abstand (Tab. 5) eingestellt, bei 0,5 R/min den Quellen zusätzlich Blei von 5 cm Dicke und ein Aluminiumblech (1 mm) vorgeschaltet. Die Strahlenhomogenität bezogen auf den Käfigmittelpunkt war durch einen Dosisleistungsabfall von bis zu 3,4 % an den Käfigenden (Längsachse) und einer Dosisleistungzunahme von bis zu 1,4 % in der Käfigtiefe (Breitachse) gekennzeichnet.

Tab. 5: Bilaterale ^{60}Co-Ganzkörperbestrahlung (Dosisleistung – Abstände, Dauer)

Dosisleistung* in Luft : Käfigmittelpunkt (R/min)		:	0,5			5,5
Abstand Quellen – Käfigmitte : Dez. 76 – Okt. 78 (m)		:	2,84 → 2,57		4,29 →	3,75
Vorgeschaltetes Abschirm- und Filtermaterial (mm)		:	Blei (50) u. Alu (1)			–
Bestrahlungsdauer (min) bei	1600 R	:	–			290,9
	1200 R	:	–			218,2
	600 R	:	1200			109,1

* Abweichungen innerhalb des Käfigs (55 cm x 97 cm Grundfläche) zwischen -3,4 % und +1,4 %

Die *Dosimetrie* wurde unter der Leitung von Frau Dipl.-Phys. E. Hochhäuser vom Institut für Biologie der GSF, Abtl. für „Angewandte Physik" durchgeführt. Sie wurde am narkotisierten Hund (14 kg KG) vorgenommen, der einmal in stehender Stellung und einmal in seiner bevorzugten Ruhestellung (Bauchseitenlage, Kopf halb eingeschlagen neben den Vorderläufen, Hinterextremitäten nahe zum Abdomen angezogen) fixiert war. Dosimetriert wurde mit Membrankondensatorkammern (Fa. Pychlau/Freiburg Brsg.), die, in Kleintierschlundsonden in ausgewählten Abständen eingesetzt, in die Speiseröhre und den Enddarm eingeführt bzw. für Messungen an der Körperoberfläche mit Leukoplast fixiert wurden. Der Quotient aus der Tiefendosis am interessierenden Ort und der in Luft gemessenen Dosis an derselben Stelle (Gewebe-Luft-Verhältnis) betrug an der Körperoberfläche zwischen 0,75 (Achsel und Leiste) und 1,03 (Nabel), im Oesophagus zwischen 0,84 (Bauchteil) und 0,89 (Schlund) und im Enddarm zwischen 0,81 und 0,88 (Tab. 6).

Tab. 6: Gewebe : Luft-Verhältnisse des Hundes* bei ^{60}Co-Ganzkörperbestrahlung und resultierende Gewebe(oberflächen)dosis** der angewandten Bestrahlung

	Tissue : Air-Ratio (TAR)***	Gewebe(oberflächen)dosis (rd) 1600 R	2400 R
Körperoberfläche			
– Hinterhauptsbein	0,87	1323	1985
– Halsmitte, ventral	0,91	1384	2076
– Axilla, rechts	0,76	1156	1734
– Axilla, links	0,75	1141	1711
– Sternum, Mitte	0,89	1354	2030
– Lendenwirbelsäule, 1.Lw	0,93	1414	2122
– Nabel	1,03	1567	2350
– Leiste, links	0,75	1141	1711
Oesophagus			
– Maul	0,87	1323	1985
– Schlundteil	0,89	1354	2030
– Halsteil	0,85	1293	1939
– Brustteil	0,88	1338	2008
– Bauchteil	0,84	1278	1916
Enddarm			
– Anus	0,86	1308	1962
– Mastdarm	0,81	1232	1842
– Colon ascendens	0,88	1338	2008
– Colon transversum	0,82	1247	1871

* 14 kg KG; einmal stehend, einmal in rechter Bauchseitenlage (Mittelwert)
** Ionendosisleistung im Bereich des Körpervolumens: 5,5 R/min (entsprechend 5,23 rd/min)
*** rd/min an ausgewählter Körperstelle: rd/min Luft an gleicher Stelle (Genauigkeit ±5 %)

3.6. Auftauen, Zelldosisbestimmung und Reinfusion der hämopoetischen Zellen

Die Hunde der Versuchsgruppe A wurden nach der KM-Entnahme sofort bestrahlt, ihre Zellen bei Raumtemperatur gelagert. Die Reinfusion nach ca. 6 Stunden über die V.cephalica antebrachii oder V.saphena parva wurde über 20 - 30 Minuten durchgeführt, wobei eine vorherige Blutabnahme von 120 bis 180 ml zur Vermeidung der Volumenüberladung des Kreislaufs angezeigt war. Die transplantierte Anzahl mononukleärer KM-Zellen ergab sich aus dem Berechnungsvorgang nach 3.2.1.

Nach Auftauen von KM und BC (Versuchsgruppe B, C, D) wurden sie in Anlehnung an die Methoden von SCHÄFER et al. (1975) und WEINER et al. (1976) gewaschen:

– langsame stufenweise Verdünnung der aufgetauten Zellsuspension in einem physiologischen Medium zur Entfernung des intrazellulären DMSO und Verhinderung osmotischer Zellschädigung
– gleichzeitige Ansäuerung (pH 6,6) zur Verhinderung von Zellverklumpungen.

Zur Ausführung: Die Blutbeutel wurden in einem 38°C-Wasserbad *aufgetaut* und eine Probe zur Zellzählung entnommen. Die *Verdünnungs*lösung aus 5 Teilen 10 %igem ACD-Medium (pH 5,4) und 1 Teil 15 %igem ACD-Plasma (pH 7,0) wurde erst tropfenweise, dann stetig schneller unter ständigem Schütteln der gleichen Menge KM bzw. BC über 6 - 8 Minuten hinzugefügt (pH 6,6). Anschließende *Zentrifugation* bei niedriger Umdrehungszahl (200 g x 7 min) wegen anzunehmender hoher Fragilität der Zellen erbrachte einen Überstand von ca. 80 Volumen %, der nach Abzweigung einer Probe zur Zählung verworfen wurde. Das so gewaschene und eingeengte Zellmaterial wurde in graduierten Volumina je nach beabsichtigter zu transplantierender Zellzahl über einen Recipient-Set-*Filter* (Fa. Fenwal-Travenol/München) reinfundiert nach erneuter Abzweigung einer Probe zur Zählung, Ausstrich und Lebend-Tot-Färbung (Trypanblautest).

Die kernhaltigen Zellen und der Prozentanteil mononukleärer Zellen in KM (Korrektur nach 3.2.1.) und BC wurden somit vor dem Einfrieren und dreimal vor Reinfusion zur Kontrolle von Zellverlusten gezählt. Eine weitere Korrektur um die Anzahl toter Zellen wurde nicht durchgeführt, da es sich um polymorphkernige Zellen (Granulozyten) handelte.

3.7. Untersuchung und Behandlung der Versuchstiere

Die Untersuchung und Behandlung der Versuchstiere erfolgte zweimal täglich in etwa 8-stündigem Abstand ab 1.Bestrahlungstag bis zum Erreichen eines klinisch zufriedenstellenden Zustandes. In diesem Zeitraum wurden die Tiere unter gleichen Bedingungen (kein Auslauf, tägl. Desinfektion) gehalten.

Neben Haltung/Verhalten, Gewicht, Ernährungszustand und Körpertemperatur fanden Veränderungen von Haut und Haarkleid, sichtbaren Schleimhäuten, Durchfall und Erbrechen als Ausdruck des *gastrointestinalen* – sowie Infektionen und Blutungen als Ausdruck des *Knochenmark – Syndroms* besondere Beachtung.

An Tagen der Bestrahlung sowie von Tag 0 bis einschließlich Tag 4 bekamen die Hunde kein Wasser und kein Futter. Parenterale *Flüssigkeits- und Elektrolytsubstitution* erfolgte je nach KG mit 250 - 500 ml Elektrolytlösung. (Tutofusin ®) zweimal am Tag subcutan bzw. bei fallenden Thrombozytenwerten intravenös (i.v.). Bei Futterverweigerung ab Tag 5 wurde parenterale

Ernährung mit 20 %iger Glucose und 10 %iger Aminosäurenlsg. (Aminoplasmin®) im Dauertropf angestrebt, anhaltende Exsikkose durch Vollelektrolytlsg. (Sterofundin®) i.v. gelindert.

Bei Fieber über 39,5°C erhielten die Tiere *Antibiotika:* 100 mg/kg KG Cephalosporine (Celospor®) und 5 mg/kg KG Gentamycin (Refobacin®) in der granulozytopenischen Phase; bei wieder ausreichend angestiegenen Leukozytenwerten (>1000/mm³) 100 mg/kg KG Ampicillin (Binotal®) mit oder ohne Gentamycin. Bei länger anhaltender Leukozytopenie oder Fieber wurden zusätzlich Nystatin (Moronal®) sowie pseudomonasspezifische Antibiotika wie Azlocillin (Securopen®) verabreicht. Bei ausgedehnten entzündlichen Maulschleimhautläsionen wurde H_2O_2, Sulfonamide (Supronal®) und 1 %ige Polymyxin-B-Sulfat-Lsg. äußerlich angewandt.

Hunde mit Erbrechen erhielten Metoclopramid (Paspertin®) intramuskulär (i.m.), solche mit Durchfall Kaolin-Pektin-Suspension (Kaoprompt-H®) über 3 Tage per os (p.o.); bei übelriechenden grau-gelben Fettstühlen vervielfachter Menge mit unverdauten Futterteilen wurde in einigen Fällen eine hochdosierte *Pankreasenzymsubstitution* (Panpur®) versucht: 2 x 1 Tabl./die.

Bei Thrombozytenwerten < 10.000/mm³ erhielten die Hunde 90 ml *thrombozytenreiches Plasma* (Gewinnung durch Vollblutzentrifugation: 4500g x 2 min) bzw. bei gleichzeitig erniedrigtem Hämatokrit (< 40) 60 ml ACD-*Vollblut.* Beides wurde jeweils vorher mit 2000 R zur Inaktivierung immunkompetenter Zellen bestrahlt.

Während des Betrahlungszeitraumes und in den ersten 3 Wochen p.TP wurden täglich mit den üblichen Routinemethoden (DÜRR et al., 1975 / BEGEMANN et al., 1977) *Leukozyten-, Thrombozyten*werte und *Hämatokrit* bestimmt sowie *Differentialblutbilder* (WRIGHT's Eosin-Methylenblau-Färbung) angefertigt; danach einmal pro Woche bis zum Tag 120 p.TP und anschließend vierteljährlich.

3.8. Laparoskopie und Autopsie

Bei 14 Hunden wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. S. GEYER / I. Medizinische Tierklinik München eine ein- oder zweimalige Laparoskopie zur *endoskopischen Inspektion der Bauchspeicheldrüse* und Entnahme einer Gewebsprobe (Biopsie) innerhalb von 14 Monaten nach 2400 R FGKB in unterschiedlichen Zeitabständen durchgeführt. Das Laparoskop nach WILD-HIRT wurde den Hunden in Vollnarkose nach Anlegen eines Pneumoperitoneums von der rechten Flanke aus eingeführt; in allen Fällen war der rechte Pankreasschenkel (Caput pancreatis) sichtbar. Die Untersuchungsergebnisse werden im einzelnen (fotografische Darstellung, Histologie)

veröffentlicht (GEYER et al., 1981) – hier wird in Tabelle 16 (Seite 47) aufgeführt, ob nach makroskopischer Befunderhebung eine deutliche Organveränderung (vergl. 3.9.) vorlag oder nicht.

Die *Sektion* gestorbener und getöteter Hunde und ihre Auswertung wurde von Human- (Frau H. KOLB) und Tierpathologen (Herren Dr. E. SCHÄFFER, Dr. L. BAYER) der Abtl. „Pathologie" des Instituts für Biologie der GSF mit der bei menschlichen Obduktionen üblichen Ausführlichkeit durchgeführt. Im Rahmen der vorliegenden Studie werden die umfassenden makroskopischen und histologischen Befunde insoweit beschrieben, als die Todesursachen im Verein mit den klinischen Beobachtungen geklärt und Anhalte über den Grad hämopoetischer Rekonstitutionen (vergl. 3.9.) sowie über chronische bzw. Strahlenspätschäden gegeben werden.

3.9. Auswertungskriterien und Statistik

Zur Beurteilung der *hämopoetischen Erholung* wurden die Leukozyten- und Thrombozytenwerte im peripheren Blut, bei gestorbenen und getöteten Hunden zusätzlich die Knochenmarkzellularität herangezogen. Bei einem Wiederanstieg der Blutwerte erfolgt er in der Regel für die Granulozyten früher als für Thrombozyten – Voraussetzung ist die Repopulation des aplastischen Knochenmarks. Die KM-Zellularität (histologische Schnitte vom Sternum) wird in Prozent der Norm angegeben, wobei 2/3 hämopoetische Zellen und 1/3 Fettgewebe als 100 % definiert wurde (KOLB et al., 1979a). Während der von THOMAS et al. (1970a) bei 5 Beagle ermittelten medianen Überlebenszeit von 10 Tagen (Bereich 9 - 12 Tage) nach 600 R GKB ohne AKMT (vergl. 2.4.) fielen die peripheren Blutwerte ständig weiter ab, das Knochenmark war *stark hypo*zellulär (1 Hund) bzw. *a*zellulär (4 Hunde). Somit wurden folgende Kriterien aufgestellt:

KM-Zellularität $\geqslant$ 10 %	=	Repopulation des Knochenmarks
Leukozytenanstieg (vergl. 4.1.)	=	Anwachsen des Transplantats
Thrombozytenanstieg (")	=	hämopoetische Erholung

Zur Beurteilung des *Strahlensyndroms* wurden die klinischen Erscheinungen in Intensität, Häufigkeit (Anzahl betr. Hunde/Hunde gesamt) und Dauer (Tage während/nach GKB), die notwendige Unterstützungstherapie (insbes. Bluttransfusionen) sowie gegebenenfalls die Todesursache herangezogen. Durchfall wurde in leicht, mäßig schwer oder schwer unterteilt, je nachdem, ob die Stühle breiig, dickflüssig oder wässrig waren. Die Laparoskopie der Bauchspeicheldrüse (hellrosarotes Organ; leicht wellige Oberfläche; zarte Septierung der Drüsenlappen) zeigte makroskopisch in ein paar Fällen Veränderungen fraglichen Krankheitswertes (injiziert; stärkere Lappung und Felderung) sowie bei einigen Hunden (vergl. 4.2.) ein pathomorphologisches Bild (Organ

weiß-blaßgelb; verkleinert bis geschrumpft; noduläre Umstrukturierung seiner Oberfläche). Letzteres wurde unter Berücksichtigung der nach VULINEC (1978) umstrittenen Aussagekraft der diagnostischen Pankreaslaparatomie als „Dystrophie" ohne weitere Differenzierung bezeichnet.

Zum *statistischen* Vergleich der Zeitspannen bis zum Leukozyten- oder Thrombozytenanstieg nach einmaliger GKB und FGKB wurde der WILCOXON RANG-Test benutzt (vgl. 4.1.1.). Für den Vergleich der Überlebensrate von Hunden, die eine unterschiedliche Anzahl mononukleärer KM-Zellen/kg KG bzw. CFU_c/kg KG erhielten, wurde der Vierfelder (FISHER's EXACT)-Test angewandt (vergl. 4.1.2.1.). Die graphische Darstellung des Verlaufs von Leukozyten-, Lymphozyten- und Thrombozytenwerten vergleichbarer Gruppen von Hunden verbindet arithmetische Mittelwerte von jeweils überlebenden Tieren. Die Variabilität betr. Werte ist in Form der Variationsbreite (Bereich) aus zugehörigen Tabellen und dem Text ersichtlich. Durchschnittliche Überlebenszeiten werden als mediane Mittelwerte aufgeführt (CAVALLI-SFORZA, 1972).

4. Ergebnisse

4.1. Erholung der Hämopoese und Überlebenszeiten nach hochdosierter Ganzkörperbestrahlung und autologer Stammzelltransplantation

Die Leukozyten im peripheren Blut stiegen nach dem durch die GKB bedingten Abfall und Tiefstpunkt in allen Fällen stetig weiter an, wenn sie wieder $\geqslant 350/mm^3$ erreicht hatten (Tag des *Anstiegs*). Der entsprechende Wert für die Thrombozyten betrug $\geqslant 40000/mm^3$. Unter Einschluß der anderen Kriterien (vergl. 3.9.) wird zunächst die blutbildende Rekonstitution nach hochdosierter GKB kontinuierlicher und fraktionierter Exposition verglichen. Anschließend wird der Einfluß der Anzahl transplantierter Zellen, zum Schluß der unterschiedlicher Fraktionierungsschemata auf die hämopoetische Erholung beschrieben.

4.1.1. 1600 R Ganzkörperbestrahlung als Einzeldosis und 2400 R Ganzkörperbestrahlung fraktioniert

6 Hunden (Versuchsgruppe A) wurden nach einer 1600 R GKB als Einzeldosis, Dosisleistung 5,5 R/min, 10,3 - 34,0 x 10^7/kg KG frische mononukleäre KM-Zellen reinfundiert (Tab. 7).

Tab. 7: Hämopoetische Erholung und Überleben von Hunden nach 1600 R-Ganzkörperbestrahlung als Einzeldosis und Transplantation frischen autologen Knochenmarks (Stand: Jan. 1981)

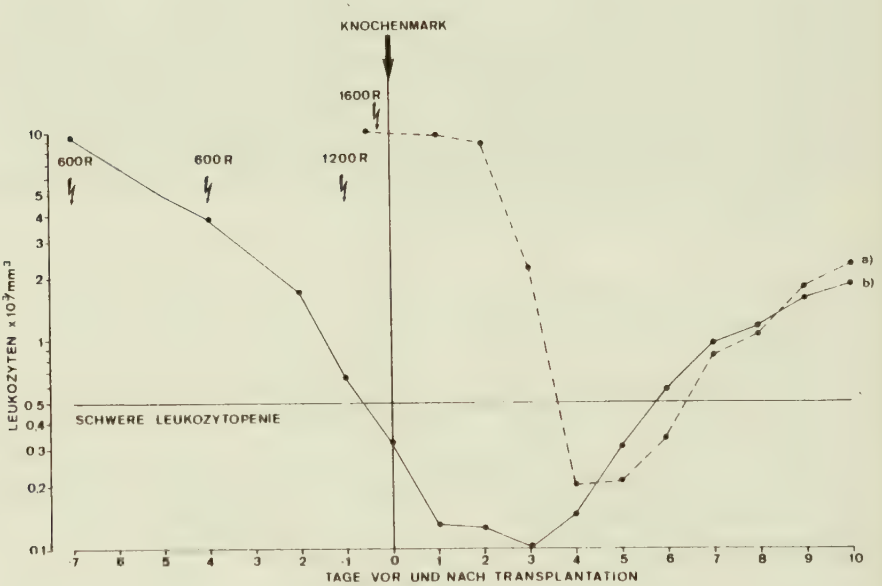
Hund Nr.	Mononukleäre KM-Zellen x 10^7/kg KG	Tag des Anstiegs der Leukozyten (≥350/mm³)	Tag des Anstiegs der Thrombozyten (≥40 000/mm³)	Überlebenszeit (Tage)	Knochenmarkzellularität (% der Norm)
D 42	10,3	7	14	244*	100
D 43	17,7	6	20	210*	100
D 39	18,5	5	11	623*	100
N 568	29,0	8	26	>510	
D 36	29,5	7	21	245*	100
N 583	34,0	8	26	>510	

* Hunde getötet aufgrund Platzmangels

Schwere *Leukozytopenie* ($< 500/mm^3$) trat ab Tag 3 oder 4 auf, schwere *Thrombozytopenie* ($< 20\,000/mm^3$) frühestens ab Tag 6, spätestens ab Tag 9 (Abb. 2/3). Der Anstieg der Werte erfolgte bei den Leukozyten zwischen Tag 5 und 8, bei den Thrombozyten am 11. bis 26. Tag p.TP.

Abb. 2: Leukozytenwerte im peripheren Blut nach unterschiedlicher Ganzkörperbestrahlung und Transplantation autologen Knochenmarks – bis 10 Tage nach Reinfusion (Mittelwerte)

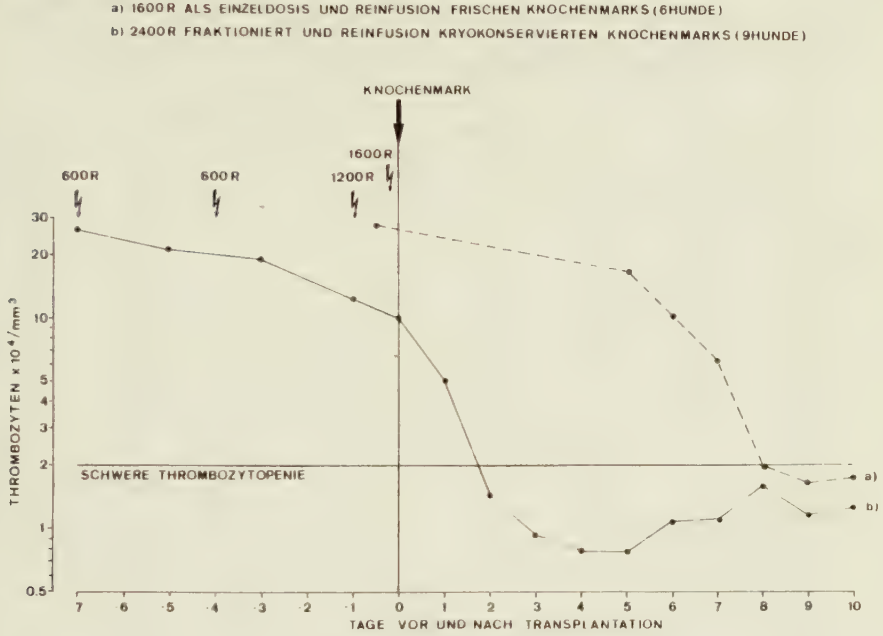
a) 1600 R ALS EINZELDOSIS UND REINFUSION FRISCHEN KNOCHENMARKS (6 HUNDE)
b) 2400 R FRAKTIONIERT UND REINFUSION KRYOKONSERVIERTEN KNOCHENMARKS (9 HUNDE)



Nach 2400 R GKB in 3 Fraktionen über eine Woche (Gruppe B/vergl. 4.1.2.1.) bestand eine schwere *Panzytopenie* bereits um den Transplantationszeitpunkt mit einer durchschnittlichen Dauer von 7 Tagen (Leukozyten) bzw. 14 Tagen (Thrombozyten), wenn ausreichende Knochenmarkmengen gegeben wurden (9 Hunde). Der Zeitraum bis zum Anstieg der Leukozyten betrug wie in Versuchsgruppe A im Mittel 6 - 7 Tage, die Zeitdauer bis zum Anstieg der Thrombozyten war nicht signifikant unterschiedlich.

3 Hunde der Versuchsgruppe A wurden nach 7 - 8 Monaten, einer nach 21 Monaten getötet – alle mit normaler KM-Zellularität. 2 Hunde sind 17 Monate p.TP wohlauf.

Abb. 3: Thrombozytenwerte im peripheren Blut nach unterschiedlicher Ganzkörperbestrahlung und Transplantation autologen Knochenmarks – bis 10 Tage nach Reinfusion (Mittelwerte)



4.1.2. 2400 R Ganzkörperbestrahlung fraktioniert innerhalb einer Woche und Reinfusion kryokonservierter hämopoetischer Zellen graduierter Anzahl

4.1.2.1. Knochenmarkzellen

32 Hunden (Versuchsgruppe B) wurden nach der Bestrahlung 0,7 - 25,0 x 10^7 mononukleäre KM-Zellen pro kg Körpergewicht (MKMZ/kg KG) reinfundiert. Schwere Leukozytopenie zeigte sich frühestens ab Tag – 1, spätestens ab Tag 1; schwere Thrombozytopenie frühestens ab Tag 0,

spätestens ab Tag 4. Bezüglich Überleben mit hämopoetischer Rekonstitution ließen sich 3 *Zelldosisbereiche* unterscheiden (Tab. 8 – Abb. 4 / 5 / 6).

Tab. 8: Hämopoetische Erholung und Überleben von Hunden (Gruppe B) nach fraktionierter 2400 R-Ganzkörperbestrahlung und Reinfusion kryokonservierten Knochenmarks unterschiedlicher Zellzahl (Stand: Jan. 1981)

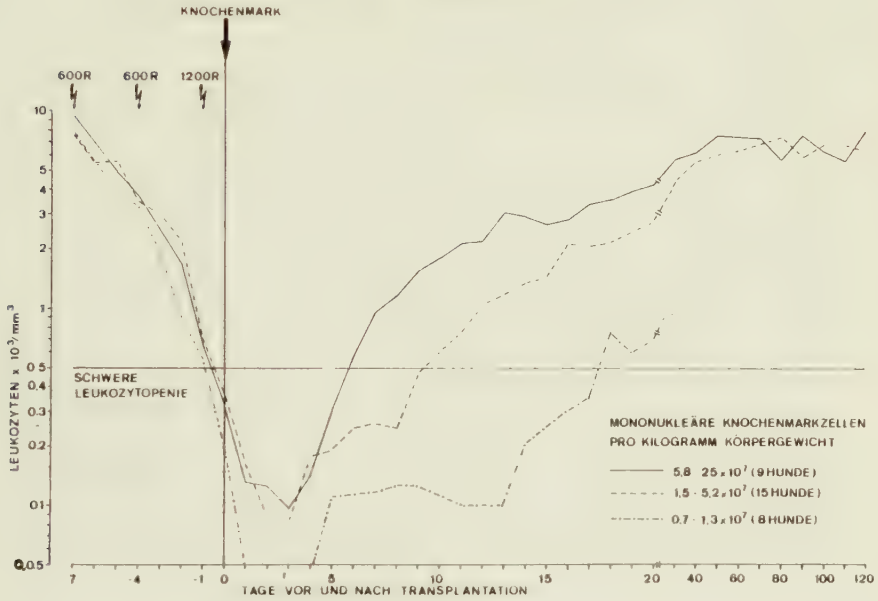
Hund Nr.	Mononukleäre KM-Zellen x 10^7/kg KG	CFUc x 10^3/kg KG	Lagerungszeit (Wochen)	Tag des Anstiegs der Leukozyten (≥350/mm^3)	Tag des Anstiegs der Thrombozyten (≥40 000/mm^3)	Überlebenszeit (Tage)	Knochenmarkzellularität (% der Norm)
D 61	25,0	n.g.	6	5	20	312*	100
D 62	20,0	n.g.	6	6	19	311*	80 - 100
D 64	20,0	n.g.	7	6	21	57**	80 - 100
N 322	12,0	n.g.	14	6	33	>1250	
D 68	9,2	n.g.	11	6	21	>1300	
D 63	7,8	n.g.	6	5	17	308*	100
L 361	7,4	n.g.	3	8	35	146*	150
L 40	7,0	n.g.	2	6	26	62	100
L 41	5,8	n.g.	2	7	27	>1300	
D 34	5,2	153,4	6	–	–	5	5
D 72	5,1	15,8	11	12	–	17	50
N 293	4,6	62,6	8	–	–	1	< 5
L 42	4,5	n.g.	4	13	–	20	25
D 67	4,4	n.g.	7	–	–	4	5 - 10
D 71	3,3	24,1	5	10	26	759	n.e.
D 69	3,3	n.g.	8	9	–	10	10 - 20
N 292	3,2	95,0	6	6	24	154***	100
D 44	3,1	9,6	6	–	–	7	5 - 10
D 70	2,8	35,0	5	10	33	209*	100
L 360	1,8	32,8	4	10	45	>1250	
N 216	1,6	21,4	9	–	–	8	10
N 270	1,5	45,0	2	12	64	1163	100
N 255	1,5	33,5	4	14	61	>1150	
N 272	1,5	n.g.	13	–	–	5	< 5
N 308	1,3	0,6	6	–	–	4	5
N 376	1,2	30,0	9	–	–	6	5
N 217	1,2	13,3	9	–	–	3	< 5
N 214	1,1	8,8	7	–	–	12	10 - 20
N 215	1,1	n.g.	9	–	–	4	5
N 259	1,0	28,4	6	18	–	31	20
N 251	1,0	1,8	6	–	–	3	< 5
N 375	0,7	3,5	8	–	–	8	5

* getötet wegen Platzmangels ** getötet wegen Paraparese *** getötet wegen chron. Hustens
n.g. = nicht getestet n.e. = nicht entnommen

9 Hunde mit einer Zelldosis von ≥ 5,8 x 10^7 MKMZ/kg KG zeigten *ausnahmslos* eine hämopoetische Erholung. Ein Hund wurde am Tag 57 euthanasiert, ein weiterer starb am Tag 62 p.TP,

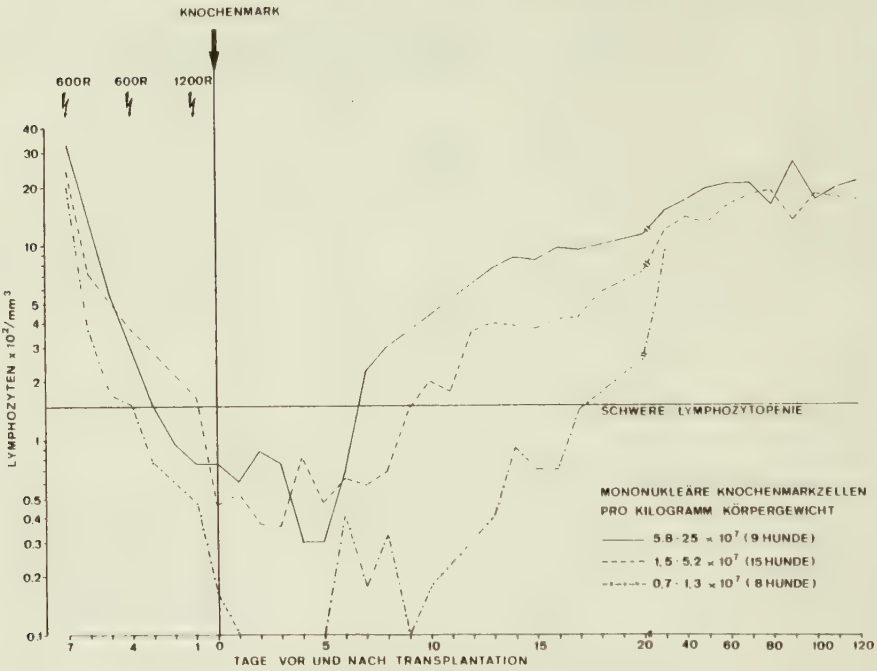
ein dritter Hund wurde nach 5 Monaten und 3 weitere wurden nach 10 Monaten getötet (vergl. 4.2.2.1.), die KM-Zellularität betrug zwischen 80 % und 150 % der Norm. 3 Hunde sind bei gutem Allgemeinbefinden 3 1/2 Jahre p.TP.

Abb. 4: Leukozytenwerte (Mittelwerte) im peripheren Blut nach fraktionierter 2400 R Ganzkörperbestrahlung und Transplantation kryokonservierter autologer Knochenmarkzellen unterschiedlicher Anzahl – bis 4 Monate nach Reinfusion



Nach einer Zelldosis von 1,5 - 5,2 x 10^7 MKMZ/kg KG wiesen *ein Teil* der Hunde (6 von 15) Leukozyten- und Thrombozytenanstieg auf. Zwei davon wurden am Tag 154 bzw. Tag 209 getötet mit 100 % KM-Zellularität, zwei Hunde starben nach 25 bzw. 38 Monaten (vergl. 4.2.3.), die anderen zwei sind im guten Zustand über 3 Jahre p.TP. Bei 3 weiteren Hunden dieses Zelldosisbereichs stiegen die Leukozyten, aber nicht die Thrombozyten an; sie überlebten 10, 17 und 20 Tage mit einer KM-Zellularität von 15 %, 50 % und 25 %. Die übrigen 6 Hunde zeigten keine Erholung der peripheren Blutwerte bei Überlebenszeiten von 1 - 8 Tagen mit einer KM-Zellularität zwischen 5 % und 10 %.

Abb. 5: Lymphozyten (Mittelwerte) im peripheren Blut nach fraktionierter 2400 R Ganzkörperbestrahlung und Transplantation kryokonservierter autologer Knochenmarkzellen unterschiedlicher Anzahl – bis 4 Monate nach Reinfusion



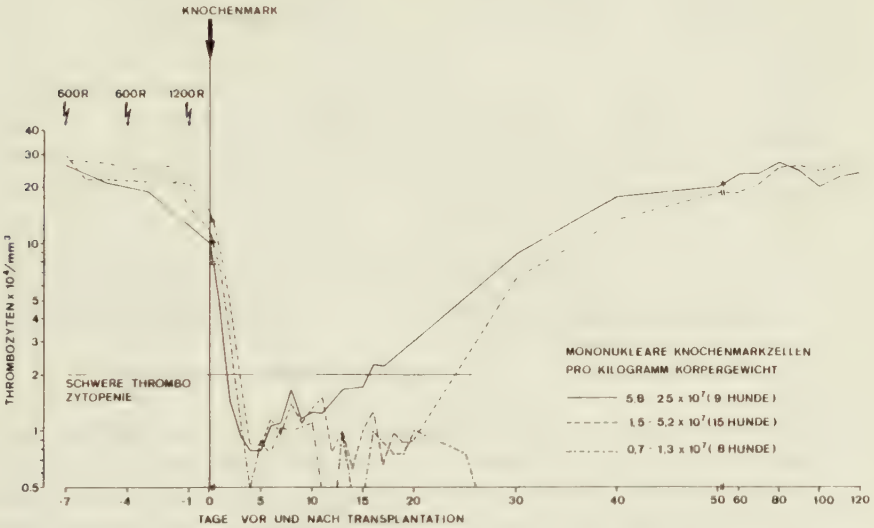
8 Hunde mit einer Zelldosis von 0,7 - 1,3 x 10^7 MKMZ/kg KG starben *ohne* Erholung der Hämopoese, einer zeigte ein Anwachsen des Transplantats (Leukozytenanstieg) bei einer Überlebenszeit von 31 Tagen und 20 % KM-Zellularität. Bei einem weiteren Hund wurde nach 12 Tagen Überlebenszeit eine Repopulation des Knochenmarks gefunden (Zellularität 20 %). Die restlichen 6 Hunde überlebten 3 - 8 Tage mit einer KM-Zellularität von 5 % der Norm (4 Hunde) oder weniger (2 Hunde).

Die *Unterschiede* in der Anzahl der Hunde mit Rekonstitution der Hämopoese pro Gesamtzahl je Zelldosisbereich (MKMZ/kg KG) sind signifikant (vergl. 3.9.):

5,8 - 25,0 x 10^7 : 9/ 9 gegenüber 1,5 - 5,2 x 10^7 : 6/15 ($p < 0{,}01$)
1,5 - 5,2 x 10^7 : 6/15 gegenüber 0,7 - 1,3 x 10^7 : 0/ 8 ($p = 0{,}01$)

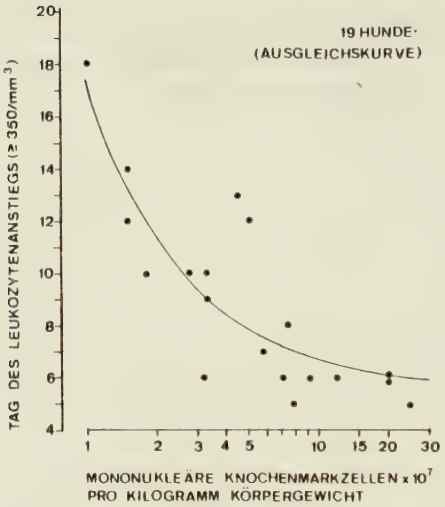
Für 18 Hunde wurde die Anzahl der transplantierten CFU_c bestimmt: von 7 Hunden, die $> 30 \times 10^3$ CFU_c/kg KG erhielten, überlebten 5; von 11 Hunden, die $\leqslant 30 \times 10^3$ CFU_c/kg KG erhielten, einer ($p < 0{,}05$).

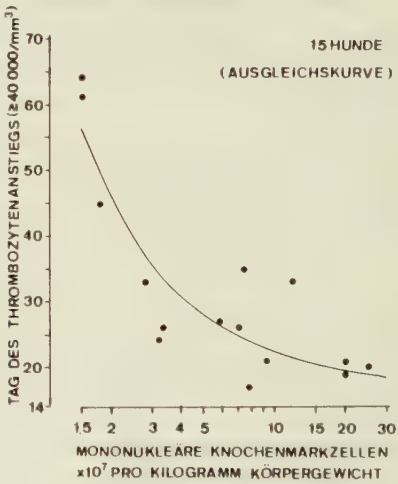
Abb. 6: Thrombozyten (Mittelwerte) im peripheren Blut nach fraktionierter 2400 R Ganzkörperbestrahlung und Transplantation kryokonservierter autologer Knochenmarkzellen unterschiedlicher Anzahl – bis 4 Monate nach Reinfusion



Die *minimale* Zellzahl, die zur hämopoetischen Erholung führte, war $1{,}5 \times 10^7$ MKMZ/kg KG (Hunde N 270, N 255) bzw. $24{,}1 \times 10^3$ CFU_c/kg KG (D 72). Eine Knochenmarkrepopulation wurde noch bei $8{,}8 \times 10^3$ CFU_c/kg KG festgestellt (N 214). Die Anzahl KM-Zellen, die für den frühest möglichen Anstieg der Leukozyten und Thrombozyten ausreicht, d.h. die *optimale* Knochenmarkmenge liegt bei etwa 1×10^8 MKMZ/kg KG. Eine Erhöhung der Zellzahl beschleunigte die Erholung der Hämopoese nicht (Abb. 7 / vergl. 4.1.3.).

Abb. 7: Anzahl der reinfundierten kryokonservierten Knochenmarkzellen nach 2400 R Ganzkörperbestrahlung (fraktioniert innerhalb 7 Tage) und Tage des Anstiegs der Leukozytenwerte und Thrombozytenwerte im peripheren Blut nach Transplantation





Der Leukozytenanstieg (≥ 350/mm³) erfolgte frühestens am Tag 5, spätestens am Tag 8 im „hohen" Zelldosisbereich, im „mittleren" Zelldosisbereich zwischen Tag 6 und Tag 14 und im „niedrigen" Zelldosisbereich am Tag 18 p.TP (1 Hund). Der Thrombozytenanstieg (≥ 40 000/mm³) erfolgte zwischen Tag 17 und Tag 35 (hoher Zelldosisbereich) bzw. zwischen Tag 24 und Tag 64 (mittlerer Zelldosisbereich).

Den *Ausgangs*bereich (untere Grenze) erreichten die Leukozyten (> 7000/mm³) und Thrombozyten (> 200 000/mm³) im Mittel nach 6 - 7 Wochen und die Lymphozyten (> 2000/mm³) 2 Monate nach Transplantation von ≥ 5,8 x 10^7 MKMZ/kg KG; im mittleren Zelldosisbereich die Leukozyten und Thrombozyten durchschnittlich nach 9 - 10 Wochen und die Lymphozyten erst nach dem Beobachtungszeitraum von 4 Monaten mit wöchentlichen Kontrollen (Abb. 4/5/6). Anschließende vierteljährliche Blutbilder waren unauffällig.

Bei den 7 *getöteten* Hunden zeigte die Histologie (KM-Zellularität 80 % - 150 %) sämtliche Elemente der Erythropoese, Granulopoese und Megakaryozytogenese. Das Verhältnis von weißer und roter Reihe war normal. Eine Markfibrose wurde nicht beobachtet.

4.1.2.2. Periphere Leukozyten

11 Hunden (Versuchsgruppe C) wurden nach GKB von 2400 R Gesamtdosis – fraktioniert wie bei Gruppe B – 19,1 x 10^7 bis 117,1 x 10^7 mononukleäre Buffycoat-Zellen pro kg Körpergewicht (MBCZ/kg KG) reinfundiert (Tab. 9). *Leuko-* und *Thrombozytopenie* setzten innerhalb des gleichen Zeitraumes ein wie für die vorangegangenen 32 Hunde beschrieben (Abb. 8 / 9 / 10).

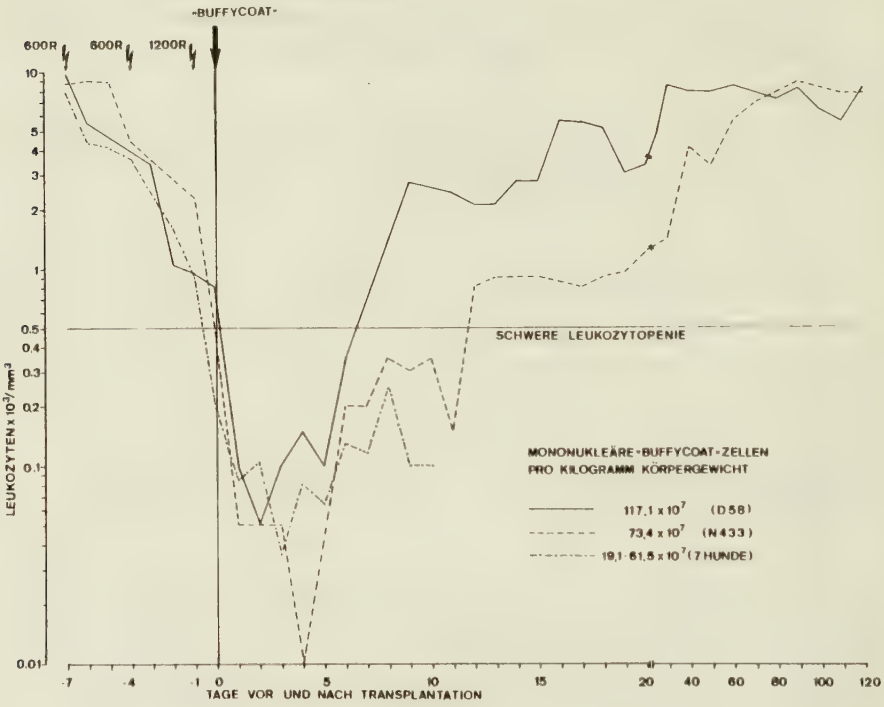
Tab. 9: Hämopoetische Erholung und Überleben von Hunden (Gruppe C) nach fraktionierter 2400 R-Ganzkörperbestrahlung und Reinfusion kryokonservierter „Buffycoat"-Zellen unterschiedlicher Anzahl (Stand: Jan. 1981)

Hund Nr.	Mononukleäre BC-Zellen x 10^7/kg KG	Lagerungs-Zeit* (Wochen)	Tag des Anstiegs der Leukozyten (≥350/mm³)	Tag des Anstiegs der Thrombozyten (≥40 000/mm³)	Überlebens-zeit (Tage)	Knochenmark-zellularität (% der Norm)
N 330	19,1	6	–	–	5	< 5
N 379	19,8	16	–	–	9	10
N 355	29,1	12	–	–	5	5
N 378	33,2	10	–	–	6	< 5
N 352	44,4	20/52	–	–	6	5
N 377	45,0	17/48	–	–	10	5 - 10
L 28	61,5	10	–	–	10	5 - 10
N 433	73,4	11	12	61	> 850	
N 212	83,1	26/44	–	–	4	< 5
N 210	86,8	12/30	–	–	7	5
D 58	117,1	8	7	27	> 850	

* 2 Zeitangaben: Zweimalige Leukozytengewinnung (vergl. 3.2.2.)

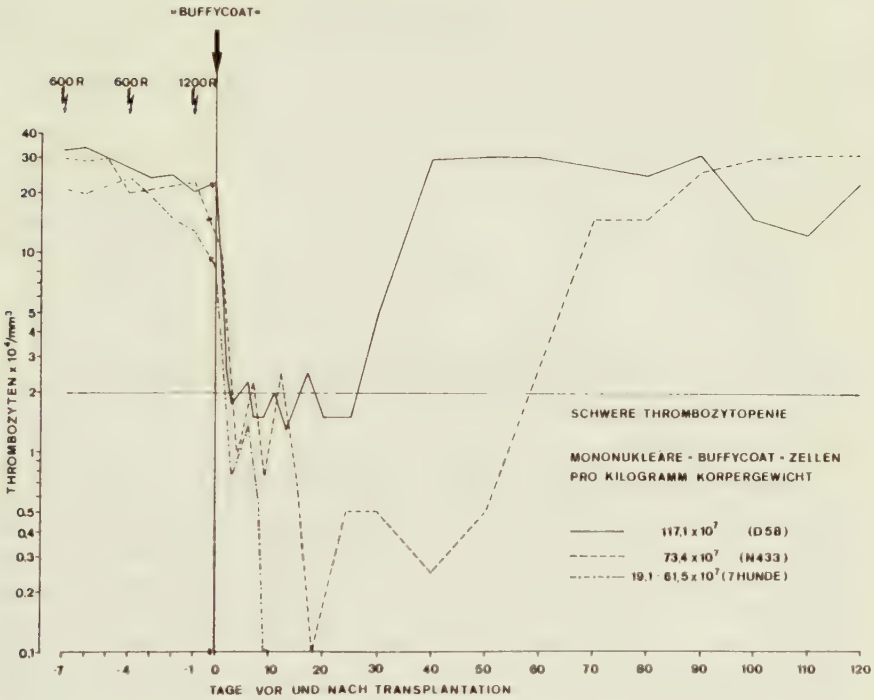
7 Hunde im *Zelldosisbereich* von 19,1 - 61,5 x 10^7 MBCZ/kg KG blieben ohne Anstieg der Leuko- und Thrombozytenwerte, überlebten 5 - 10 Tage mit einer KM-Zellularität von 5 - 10 % (5 Hunde) bzw. < 5 % (2 Hunde). Zwei von 4 Hunden im Zelldosisbereich von 73,4 - 117,1 x 10^7 MBCZ/kg KG starben am Tag 4 bzw. Tag 7 ohne Erholung der peripheren Blutwerte und mit einer KM-Zellularität um 5 %. Die zwei anderen (Hunde D 58, N 433) zeigten eine hämopoetische Rekonstitution und sind seit über 2 1/4 Jahren p.TP wohlauf.

Abb. 8: Leukozytenwerte im peripheren Blut nach fraktionierter 2400 R Ganzkörperbestrahlung und autologen „Buffycoat"-Zellen unterschiedlicher Anzahl – bis 4 Monate nach Reinfusion



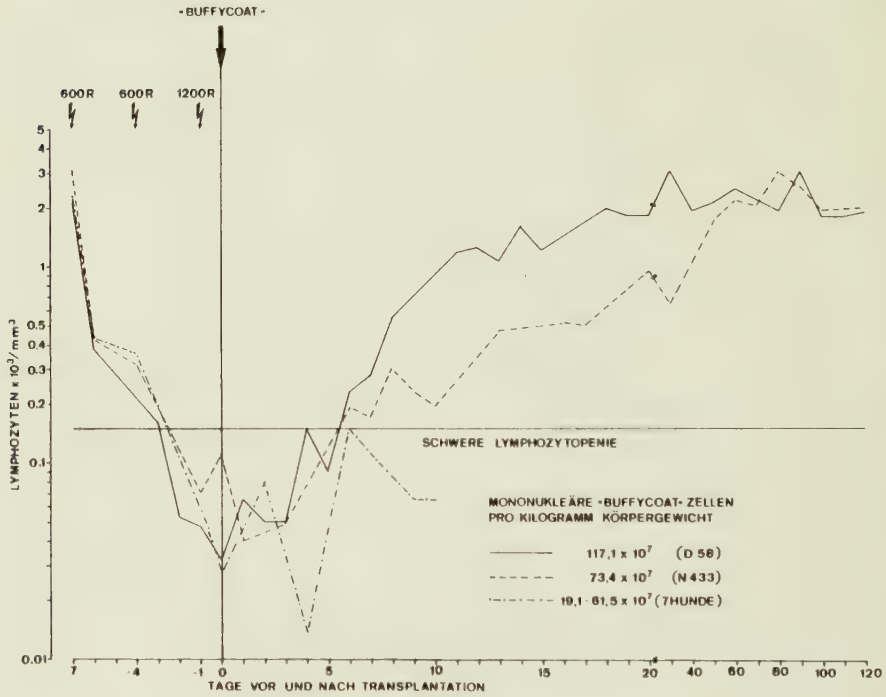
Der Zeitpunkt des Anstiegs der *Leukozyten* (7. Tag) und *Thrombozyten* (27. Tag) von Hund D 58 sowie ihre weitere Erholung (innerhalb von 7 Wochen) entspricht denen von Hunden, die „suboptimale" KM-Zelldosen (6 - 7 x 10^7 MKMZ/kg KG) erhielten – während der Anstieg dieser Blutwerte von Hund N 433 (12. bzw. 61. Tag) und das Erreichen ihrer Ausgangswerte (innerhalb von 12 Wochen) mit denen der Hunde vergleichbar ist, die minimale KM-Mengen (1,5 x 10^7 MKMZ/kg KG) zurückbekamen (Tab. 8, Seite 26). Danach war im Vergleich zum Knochenmark die *20 - 50fache Anzahl* mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut notwendig zur Rekonstitution nach hochdosierter Ganzkörperbestrahlung (Tab. 10).

Abb. 9: Thrombozytenwerte im peripheren Blut nach fraktionierter 2400 R Ganzkörperbestrahlung und autologen „Buffycoat"-Zellen unterschiedlicher Anzahl – bis 4 Monate nach Reinfusion



Die *Lymphozyten*ausgangswerte (< 2000/mm³) erreichten die beiden Hunde mit BC-Transplantat deutlich früher als die überlebenden Hunde nach KMT (vergl. 4.1.2.1.): Anfang der 4. Woche

Abb. 10: Lymphozytenwerte im peripheren Blut nach fraktionierter 2400 R Ganzkörperbestrahlung und autologen „Buffycoat"-Zellen unterschiedlicher Anzahl – bis 4 Monate nach Reinfusion



(Hund D 58) und Ende der 8. Woche p.TP (Hund N 433). Vierteljährliche Blutbilder der beiden Hunde nach dem 120-Tage-Beobachtungszeitraum waren ohne Besonderheit.

Tab. 10: Hämopoetische Erholung und Überleben von Hunden nach 2400 R Ganzkörperbestrahlung (fraktioniert innerhalb 7 Tage) und Infusion autologer Knochenmarkzellen oder „Buffycoat"-Zellen unterschiedlicher Anzahl – Zusammenfassung

Zelldosisbereich (Mononukleäre Zellen x 10^7/kg		Anzahl der Hunde	Mit Anstieg der Leukozyten (≥350/mm^3)	Thrombozyten (≥40 000/mm^3)	Mit Überlebenszeit von > 30 Tagen	Überlebenszeiten unter einem Monat (Tage)
5,8 - 25,0	KM	9	9	9	9	
1,5 - 5,2	KM	15	9	6	6	1,4,5,5,7,8,10,17,20
0,7 - 1,3	KM	8	1	0	1	3, 3, 4, 4, 6, 8, 12
73,4 - 117,1	BC	4	2	2	2	4, 7
19,1 - 61,5	BC	7	0	0	0	5, 5, 6, 6, 9, 10, 10

4.1.3. 2400 R Ganzkörperbestrahlung unterschiedlicher Fraktionierung

Wurden die 3 Fraktionen der 2400 R-Ganzkörperbestrahlung innerhalb von 5 oder 3 Tagen verabreicht (Versuchsgruppe D), trat – bezogen auf Tag 0 – die schwere *Leukozytopenie* (< 500/mm^3) im Mittel 1 1/2 Tage, die schwere *Thrombozytopenie* (< 20 000/mm^3) durchschnittlich 2 1/2 Tage später auf (Abb. 11, Seite 39 / Abb. 12, Seite 41) als bei Fraktionierung über 7 Tage (Gruppe B). Der *Anstieg* der Blutwerte wiederum erfolgte im gleichen Zeitraum, selbst wenn das bis zu 5-fache der als optimal definierten Knochenmarkmenge gegeben wurde (Tab. 11). Die Zeitdauer (Mittelwerte) zum Erreichen der *Ausgangs*werte verlängerte sich für die Thrombozyten um 1 Woche (8 Wochen), die für die Leukozyten (6 - 7 Wochen) und Lymphozyten (9 Wochen) war identisch.

Eine 30 Tage-*Überleben*srate nach Reinfusion mononukleärer KM-Zellen ausreichender Anzahl (≥ 5,8 x 10^7/kg KG) erreichten alle 9 Hunde bzw. 7 von 8 Hunden bei Fraktionierung der GKB über 7 bzw. 5 Tage, aber nur 1 von 4 Hunden nach täglicher Bestrahlung. Die angewandten Dosisraten für die 600 R-Fraktionen (0,5 R/min und 5,5 R/min) bewirkten keinen Unterschied im Ablauf der blutbildenden Rekonstitution. Die Überlebenszeit der gestorbenen Hunde betrug 1, 2 und 5 Tage (Gruppe D_3) bzw. 6 Tage (Hund N 551/Gruppe D_1) mit einer Knochenmarkzellularität von 5 %, 5 % und 5 - 10 % bzw. 10 %. Ein Hund (N 323/Gruppe D_2) starb 32 Monate p.TP an den Folgen einer Rauferei.

Tab. 11: Hämopoetische Erholung und Überleben von Hunden nach 2400 R-Ganzkörperbestrahlung unterschiedlicher Fraktionierung/Protrahierung und Reinfusion kryokonservierten Knochenmarks ausreichender Menge (Stand: Jan. 1981)

Versuchsgruppe (vergl.3.1.)	Hund Nr.	Mononukleäre KM-Zellen x 10^7/kg KG	Lagerungszeit (Wochen)	Tag des Anstiegs der Leukozyten (≥350/mm^3)	Tag des Anstiegs der Thrombozyten (≥40 000/mm^3)	KM-Zellularität* (% der Norm)	Überlebenszeit (Tage)
D_1	N 369	11,2	25	8	33		>950
	L 373	15,8	n.r.	7	26		>950
	N 501	45,9	2	6	22		>750
	N 551	54,3	2	–	–	10	6
D_2	N 323	20,8	24	7	31	100	966
	N 241	22,8	13	8	25		>850
	N 445	31,5	4	5	32		>800
	N 511	36,0	2	6	23		>750
D_3	N 262	36,4	11	6	29		>900
	P 1	31,4	10	–	–	5 - 10	5
	N 432	50,7	2	–	–	5	2
	N 451	43,2	9	–	–	5	1
B	9 Hunde	12,7	6	6	24	100	vergl.
	(D 61 - L 41)	(5,8-25,0)	(2-14)	(5-8)	(17-35)	(L 40)	Tab. 8

* gestorbener Hunde (getötete nicht einbezogen) n.r. = nicht registriert

Die übrigen 7 Hunde der Gruppe D sind 2 Jahre nach Transplantation wohlauf; vierteljährliche Blutbilder in diesem Zeitraum waren ohne besonderen Befund.

4.2. Strahlenkrankheit und Todesursachen nach unterschiedlicher Bestrahlungskonditionierung zur autologen Stammzelltransplantation

Die klinischen Symptome der Strahlenkrankheit *(Strahlensyndrom)* nach fraktionierter 2400 R GKB und Reinfusion hämopoetischer Zellen waren die gleichen wie nach 1600 R GKB als Einzeldosis und AKMT. Unterschiede ergaben sich im Zeitpunkt des Auftretens, in Dauer und Schweregrad bzw. der Anzahl betroffener Hunde. Zunächst seien Haut- und Haarkleidveränderungen, die schwererwiegenden gastrointestinalen Symptome und das Knochenmarksyndrom sowie Krankheitszeichen geringerer klinischer Relevanz am Beispiel der Einzeitbestrahlung *im einzelnen* aufgezeigt.

4.2.1. Kontinuierliche Strahlenexposition

Die 6 Hunde (Versuchsgruppe A) zeigten in der 2.Woche p.TP ein trockenes *Erythem* an den Ohrlappen mit folgender *Desquamation* und *Pigmentierung* ab der 3.Woche sowie bleibendes generalisiertes *Fellergrauen* unterschiedlicher Stärke mit leichtem *Haarausfall* ab der 7. Woche nach Bestrahlung.

Eine *Stomatitis* trat nur andeutungsweise bei Hund N 568 auf, verstärkter Speichelfluß *(Ptyalismus)* bei allen Hunden in den ersten Tagen nach GKB. Zur gleichen Zeit, z.T. auch schon während oder kurz nach der Strahlenexposition, war *Erbrechen* zu beobachten. Mäßig schwerer *Durchfall* zog sich über einen längeren Zeitraum hin (Tag 3 bis 11), zu gehäuftem Auftreten kam es Ende der 1.Woche. Die gastrointestinalen Symptome wurden von einem durchschnittlichen *Gewichtsverlust* von 10 % und mäßiger *Dehydration* Anfang der 2.Woche begleitet. Bei 3 Hunden (D 42, N 568, N 583) deuteten massige, grau-gelbe *Fettstühle* ab Anfang der 3.Woche sowie abermaliger Gewichtsverlust nach vorübergehender Erholung auf pankreatogen bedingte Malabsorbtion hin mit der Dauer von etwa 2 Monaten. Diese Hunde wurden nicht enzymsubstituiert und erreichten innerhalb von 4 Monaten nicht wieder ihr Ausgangsgewicht.

Fieber ($> 39^{o}$) trat – zweiphasig – in der 2.Hälfte der ersten Woche und in der 3.Woche auf. Erhöhte Blutungsbereitschaft äußerte sich in *Teerstuhl* bzw. blutigem Durchfall, *Haematemesis* und beim Hund N 568 noch an den Tagen 11 - 15 in *Petechien* der Maulschleimhaut. *Schleimhautblässe* bei deutlich erniedrigtem Hämotokrit ($\leqslant 35$) verzeichneten 4 Hunde in der 2.Woche, zwei davon (D 36, D 42) auch Anfang der 4.Woche p.TP. Thrombozytenreiches Plasma bzw. Vollbluttranfusionen (vergl. 3.7.) mußten im Mittel 2 mal pro Hund verabreicht werden, wobei Hund D 36 4 benötigte und 2 Hunde (D 39, D 42) ohne Transfusionen auskamen. Veränderungen, die den Allgemeinzustand nicht wesentlich beeinflußten, und etwa die Hälfte der Hunde

(auch der anderen Versuchsgruppen) innerhalb der ersten 3 Wochen nach GKB betrafen, war eine mäßig schwere, entzündliche *Skrotumschwellung,* eine *Konjunktivitis,* vereinzelt mit schleimigem Exsudat, und *Rhinitiden* mit klarem Ausfluß. Einen klinisch zumindest zufriedenstellenden Eindruck machten alle Hunde innerhalb von 4 Wochen nach der einmaligen GKB.

Bei der *Autopsie* der 4 auf Grund Platzmangels getöteten Hunde (vergl. 4.1.1.) fanden sich Herde chronischer Pneumonie mit geringer Fibrose (D 43) und beim Hund D 42 eine herdförmige Pleurafibrose von fraglichem Krankheitswert sowie Pankreasdystrophie und -fibrose leichten bis mittleren Grades. Die Sektion der Hunde D 36, D 39 blieb ohne besonderen Befund (Tab. 15).

4.2.2. Ganzkörperbestrahlung unterschiedlicher Fraktionierung und Infusion autologer Knochenmarkzellen ausreichender Anzahl

Während der FGKB waren alle Hunde bis zum 2.Bestrahlungstag bei ungestörtem gutem Allgemeinbefinden. Dann traten zuweilen erste gastrointestinale Symptome leichterer Art und bei einigen Tieren Fieber auf. Das Wohlbefinden verschlechterte sich zusehends um den Transplantationstag und danach: für den weiteren Krankheitsverlauf ergaben sich Unterschiede je nach transplantierter Zellzahl (s. 4.2.3.) und Bestrahlungsschema. Zunächst wird der *Einfluß der Fraktionierung* an Hunden mit ausreichender Anzahl reinfundierter KM-Zellen dargestellt (Abb. 11).

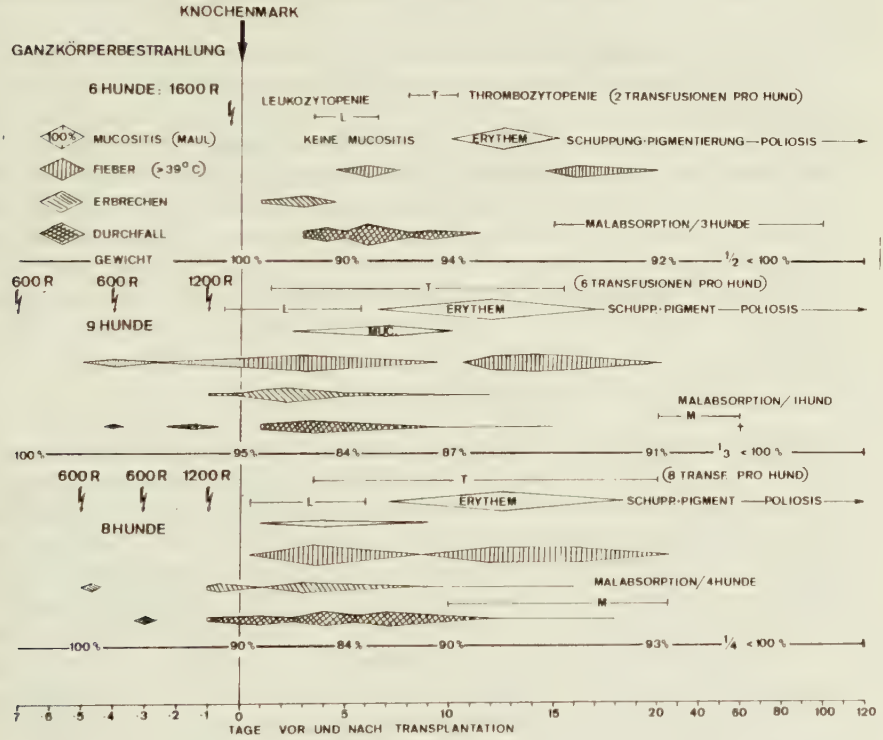
4.2.2.1. Dreitägliche Bestrahlung

Von 9 Hunden (Versuchsgruppe B/$\geqslant 5{,}8 \times 10^7$ MKMZ/kg KG) zeigten 8 ab Anfang der 2.Woche p.TP eine mäßig starke Hautrötung an den Ohrlappen, z.T. auch an der Vorderbrust, seltener generalisiert (2 Hunde). Anschließende trockene Schuppung und Pigmentierung waren bei 6 Hunden zu beobachten, die Poliosis unterschiedlicher Ausprägung wies das Haarkleid nach ca. 50 Tagen auf.

Eine *Entzündung der Maulschleimhaut* in Form *schmutzig-grauer, schleierartiger Beläge* manifestierte sich Mitte der ersten Woche bei 4 Hunden – sie blieb in 3 Fällen auf die Mukosaoberfläche begrenzt und war innerhalb von 7 Tagen abgeklungen. Unter der letzten Bestrahlungsfraktion und über 3 bis 4 Tage danach traten Brechreiz und/oder Erbrechen auf, die beim Hund D 63 bis in die 2.Woche anhielten. Unter leichter *Diarrhoe* litt Hund D 64 schon am 2. Bestrahlungstag, ein weiterer (D 62) am Tag -1 und die meisten unter *leichter bis mäßig schwerer Form* für die Dauer von 3 - 4 Tagen in der 1. Woche bei gleichzeitigem Ptyalismus. Mäßige Dehydration zeigte der Hautturgor meist auch innerhalb der ersten 7 Tage nach FGKB an, beim Hund D 63 schon vor der Transplantation (a.TP). Der Gewichtsverlust betrug durchschnittlich 16 %;

nach 3 Wochen waren wieder 90 % des Ausgangsgewichts erreicht - 3 Hunde (D 62, D 63, L 361) blieben 4 Monate unter dem Ausgangswert.

Abb. 11: Strahlensyndrom nach hochdosierter Ganzkörperbestrahlung und Transplantation autologen Knochenmarks:
– 1600 R als Einzeldosis
– 2400 R unterschiedlicher Fraktionierung



Erhöhte Temperatur für mehrere Tage a.TP betraf 2 Hunde (L 40, L 41), fast alle Hunde aber regelmäßig zweiphasig: in der 1.Woche und um den 14.Tag p.TP. Blutiger Kot bzw. Teerstuhl war bei 3 Hunden Anfang der 2.Woche aufgetreten; Haematemesis bei 3 Hunden in der ersten

Woche, beim Hund D 63 auch noch am Tag 12. Im Mittel waren je Hund an 6 Tagen (3 - 12 Tagen) eine Transfusion thrombozytenreichen Plasmas oder Vollbluts notwendig. Anämische Schleimhäute und schwach gefüllte Episkleralgefäße korrelierend mit einem Hämatokrit $\leq$ 35 wurden bei 4 Hunden Ende der 3.Woche oder in der 4.Woche festgestellt. Alle Hunde waren nach 4 Wochen in klinisch zufriedenstellendem Zustand.

Der Hund L 40 zeigte ab Tag 60 Schwäche der Nachhand, plötzliches blutiges Aufbrechen einer abgeheilten Maulschleimhautulzeration sowie ausgeprägte Stearrhoe. Er starb am Tag 62. Der *Autopsie*befund ergab das Bild einer akuten hämorrhagischen Pankreatitis und miliare Nekroseherde in der Leber – der Hund war einige Tage zuvor versehentlich mit Leptospirose-Vakzine geimpft worden. Beim Hund D 64 trat ab Tag 55 eine doppelseitige motorische Lähmung der Hinterhand auf verbunden mit dem Unvermögen zum Harnabsatz; er wurde 2 Tage später euthanasiert. Veränderungen waren nur histologisch feststellbar und bestanden aus perivaskulären Rundzellinfiltraten im Gehirn und Rückenmark mit starker Meningenbeteiligung (ausgeprägte nichteitrige Meningoencephalomyelits). Ähnliche Veränderungen (Granulomencephalitis) sowie herdförmige Pleurafibrosen wurden beim Hund L 361 nachgewiesen, der 5 Monate nach AKMT in klinisch unauffälligem Zustand wegen Platzmangels getötet wurde. Die anderen 3 aus diesem Grunde 10 Monate p.TP getöteten Hunde (vergl. 4.1.2.1.) wiesen eine leichte bis mäßig schwere Pankreasdystrophie und -fibrose auf, eine herdförmige Pyelitis von fraglichem Krankheitswert (D 61, D 62), Wurmlarven in der Lunge (D 61) und Hund D 62 lymphohistiozytäre Infiltrate in der Leber (Tab. 15).

4.2.2.2. Zweitägliche und tägliche Bestrahlung

Das Krankheitsbild in den *Versuchsgruppen* D_1 und D_2 (2-tägliche Fraktionierung, unterschiedl. Dosisleistungen) stimmte weitestgehend überein (zusammengefaßte Darstellung in Abb. 11 / 8 Hunde) und glich dem der 9 vorher beschriebenen Tiere. Haut- und Haarkleidveränderungen, verstärkt-kontinuierlicher Speichelfluß und hämorrhagische Diathese traten in gleichen Zeiträumen und Intensität auf, wobei allerdings im Mittel 8 (2 - 15) Bluttransfusionen pro Hund gegeben werden mußten. Die erste Fieberphase ergab sich nach Transplantation mit Höhepunkt am Tag 3 und ging am Tag 8/9 in die zweite febrile Phase mit Höhepunkt in den Tagen 12 - 16 über bei einer Gesamtdauer von bis zu 3 Wochen. Maulmukositiden entwickelten sich gar nicht oder schwach (Hund N 369) – außer beim Hund N 551, der schwer dehydratiert sowie anämisch war und mit einem Gewichtsverlust von 23 % am Tag 6 an einer hämorrhagisch-fibrinösen Pneumonie und Oesophagitis starb. Erbrechen trat in 3 der 8 Fälle schon während des Bestrahlungszeitraums auf; *mäßig schwere Durchfälle* bei der Hälfte der Hunde auch noch am Anfang der 2.Woche p.TP. Nach einem durchschnittlichen Gewichtsabfall um 16 % waren am Tag 10 wieder 90 % des Ausgangsgewichts erreicht, die weitere Erholung verlief langsam – die Hunde N 241 und N 445 blieben bis zum Tag 120 noch unter ihrem Ausgangswert. Zwei Hunde je Gruppe (N 369

L 373 bzw. N 241, N 445) setzten „Pankreaskot" von der 2. bis in die 4.Woche und länger (N 241) ab; eine Enzymsubstitution wurde bei je einem Hund (N 369, N 241) durchgeführt (Tab. 16).

Unter besonders schwerer Malabsorption mit Meteorismus litt Hund N 262 aus *Versuchsgruppe* D_3 ab Ende der 2.Woche nach 2400 R GKB in täglichen Fraktionen. Sein Stuhl normalisierte sich erst nach 5 Monaten (Enzymsubstituion ab Tag 15). Bei vorübergehendem Gewichtsverlust von fast 30 %, der durch schwerste blutig-wässrige Durchfälle in den ersten 1 1/2 Wochen p.TP bedingt war (Abb. 12), erreichte das Tier nach 1 1/4 Jahren wieder sein Normalgewicht. Die anderen

Abb. 12: Hund N 262 nach 2400 R-Ganzkörperbestrahlung in täglichen Fraktionen und Transplantation autologen Knochenmarks – Entwicklung innerhalb von 40 Tagen

3 Hunde dieser Gruppe überlebten den auf Grund starken Erbrechens, kontinuierlicher Salivation und insbesondere *anhaltender dünnflüssiger, kolliquativer Diarrhoen* extrem hohen Eiweiß- und

Flüssigkeitsverlust nicht. Die Substituionstherapie vermochte Hämatokritwerte von ⩾ 55 nicht zu erniedrigen, wobei subkutan verabreichte Elektrolytlsg. in dem von Erschöpfung und Hinfälligkeit gekennzeichneten exsikkotischen Zustand kaum noch resorbiert wurde. Der Hund P 1 verstarb nach zweitägigem Fieber am Tag 5 an einer hämorrhagischen Pneumonie und Oesophagitis sowie Schleimhautdysplasie des Dünndarms. Die Hunde N 451 und N 432 starben mit irreversibler allgemeiner Kreislaufstörung (dekompensierter hypovolämischer Schock) 24 bzw. 48 Stunden p.TP – bei ihnen betraf die Schleimhautdysplasie den ganzen Magen-Darm-Kanal einschließlich Oesophgus, am ausgeprägtesten Duodenum und Colon (Tab. 12).

Tab. 12: Schleimhautdysplasie (Verdauungskanal) nach 2400 R-Ganzkörperbestrahlung unterschiedlicher Fraktionierung und verschiedenen Überlebenszeiten

Überlebenszeit	1 Tag		2 Tage	4 Tage	5 Tage		6 - 7 Tage	
GKB	täglich	3-tägl.	täglich	3-tägl.	täglich	3-tägl.	2-tägl.	3-tägl.
Oesophagus	+	(+)	++	(+)	+	+	?	–
Duodenum	+++	+-	+++	(+)	++	+	(+)	(+)
Jejunum	+++	n.e.	++	–	+	(+)	–	–
Ileum	+++	n.e.	++	–	–	–	–	–
Caecum	+++	n.e.	++	–	–	–	–	–
Colon	+++	–	+++	–	–	–	–	–
Rectum	+++	n.e.	++	–	–	–	–	–
Hund Nr.	N 451	N 293	N 432	D 67	P 1	D 34	N 551	D 44
Versuchsgruppe	D_3	B	D_3	B	D_3	B	D_1	B

– negativ (+) sehr leicht + leicht ++ mäßig schwer +++ schwer ? fraglich (entzündet)
n.e. nicht entnommen

4.2.3. Ganzkörperbestrahlung gleichbleibender Fraktionierung und Reinfusion hämopoetischer Zellen reduzierter Anzahl

Der Einfluß verminderter Anzahl hämopoetischer Zellen im Transplantat auf das Krankheitsbild nach 2400 R GKB gleichbleibender Fraktionierung (Tag -7, -4, -1) wurde an Hunden aus der Versuchsgruppe B ($\leqslant 5{,}2 \times 10^7$ MKMZ/kg KG) und denen der Gruppe C untersucht. 16 Hunde starben innerhalb einer Woche, 10 weitere innerhalb eines Monats (Tab. 13) – 8 Hunde überlebten die akuten und subakuten Strahlenschäden.

Von den insgesamt 34 Hunden wiesen bei den z.T. sehr kurzen Überlebenszeiten nur 7 Hunde Haut- und Haarkleidveränderungen auf (Erythem, Desquamation, Pigmentierung, leichter Haarausfall, Poliosis). 15 Hunde litten unter ausgeprägten *Stomatitiden* meist ab Mitte der ersten Woche p.TP. Der Entzündungsprozeß durchsetzte obere Schleimhautpartien (Bildung *geschwüriger* Defekte) oder verwandelte die Mucosa stellenweise in ganzer Tiefe in eine *nekrotische* Masse (Kolliquationsnekrose). Die Läsionen blieben in den überwiegenden Fällen *ohne* jegliche *Heilungstendenz* bzw. zeigten bei überlebenden Hunden den Übergang in eine produktive Entzündungsform mit beginnender Organisation der Wundränder erst in der 2. oder 3.Woche. Der typische kontinuierlich-verstärkte Speichelfluß, Erbrechen und besonders Durchfälle führten zu mäßig schweren (9 Hunde) bis schwersten *Exsikkosen* (4 Hunde) mit extremer Bluteindickung (Hämatokrit 56 - 58). 6 Hunde waren von starker Abmagerung bis zur *Kachexie* mit Gewichtsabfall von 20 - 30 % betroffen, ansonsten lag der Verlust bei 15 - 20 %. Das Ausgangsgewicht wurde von 3 der 8 Hunde innerhalb von 4 Monaten nicht wieder erreicht. *Fieber* trat bei perakutem tödlichem Krankheitsverlauf (≤ 3 Tage) über 1 - 2 Tage, bei akutem Ablauf (≤ 14 Tage) in allen Hunden *durchgehend* auf – 10 Hunde hatten auch noch in der 3. - 4.Woche deutlich erhöhte Körpertemperatur. Bei einem Drittel der Tiere beeinträchtigte Husten mit/ohne *Dyspnoe* in der 1. und/oder 2.Woche das Allgemeinbefinden erheblich. Die hämorrhagische Diathese äußerte sich in Schleimhautpetechien und vereinzelter *Epistaxis* sowie blutigem Kot bzw. Teerstuhl (12 Hunde) und Hämatemesis (10 Hunde). Verschorfte Schleimhautherde im Maul von 9 Hunden

Tab. 13: Gastrointestinale / „Knochenmark"-Symptome und Überleben nach hochdosierter fraktionierter Ganzkörperbestrahlung und Reinfusion hämopoetischer Zellen: Einfluß der Zellzahl

Behandlung	Erbrechen	Gewichtsverlust bis zu	Durchfall	Bluttransfusionen	Stomatitis	Fieber ➚ 39°C	7/30 Tage	Überleben – gesamt
2400 R / 3-tägl. ↑ Zellzahl	++	11 - 21 %	+ - ++	6 (3-12)	+ - ++	1.Woche/ 10.-20.Tag	9/9 - 9	
2400 R / 3-tägl. ↓ Zellzahl	++ - +++	30 %	++	14 (9-20)	++	durchgehend bis 4. Woche	12/8 - 19	
2400 R / 3-tägl. ↓↓ Zellzahl	++	27 %	++ - +++	fast tägl.	+++	↷ Überlebenszeit	6/1 - 16	

↑≥ 5,8 x 10^7 MKMZ/kg KG ↓ 1,5 - 5,2 x 10^7 MKMZ/kg KG bzw 73,4 117,1 MBCZ/kg KG ↓↓ 0,7 - 1,3 MKMZ/kg KG bzw 19,1 - 61,5 x 10^7 MBCZ/kg KG

+ leicht ++ mäßig schwer +++ schwer

Tab. 14: Todesursachen nach 2400 R – Ganzkörperbestrahlung (fraktioniert innerhalb 7 Tage) und Reinfusion hämopoetischer Zellen *reduzierter* Anzahl

	Hund Nr.	Überlebens-zeit (Tage)	Anstieg*/KM-Zellularität (%)	Schleimhaut-dysplasie**	Todesursache
1,5 - 5,2 x 10^7 MKMZ/kg KG	N 293	1	– / < 5	Oes.(+), Duo. ++	Septikämie, Pneumonie
	D 67	4	– / 5-10	Oes.(+), Duo.(+)	Hämorrhag. Pneumonie
	D 34	5	– / 5	Oes.+, Duo.+, Jej.+	Pharynxödem, Septikämie
	N 272	5	– / < 5	Oes. (+)	Septikämie, Blutungen
	D 44	7	– / 5-10	Duo. +	generalisierte Blutungen
	N 216	8	– / 10	Duo. (+)	Septikämie, Enteritis
	D 69	10	9. / 10-20	–	generalisierte Blutungen
	D 72	17	12. / 50	Duo. ?	Blutungen, hämorrhag. Nephritis, Kachexie
	L 42	20	13. / 25	–	Oesophagitis, Kachexie
0,7 - 1,3 x 10^7 MKMZ/kg KG	N 217	3	– / < 5	Oes. +, Duo. +, Jej. +	Blutungen, Septikämie
	N 251	3	– / < 5	Oes. (+), Duo. +, Jej. +	Maulphlegmone, hämorrhag. Pneumonie
	N 308	4	– / 5	Duo. +, Jej. +	Septikämie, Oesphagitis
	N 215	4	– / 5	Oes. (3), Duo. +, Jej. +	Blutungen, Pneumonie, Maulphlegmone
	N 376	6	– / 5	–	Septikämie, Maulphlegmone
	N 375	8	– / 5	–	hämorrhag. Pneumonie
	N 214	12	– / 10-20	Duo. +	Blutungen, hämorrhag. Pneumonie
	N 259	31	18. / 20	–	Anämie, Blutungen, Septikämie
19,1 - 61,5 MBCZ/kg KG	N 212	4	– / < 5	a.	Enteritis, Lungenödem, Blutungen
	N 330	5	– / < 5	Duo. +, Jej. (+)	Septikämie, Blutungen, Oesophagitis
	N 355	5	– / 5	Duo. +, Jej. (+)	Pharynxödem, hämorrhag. Pneumonie
	N 378	6	– / < 5	Duo. (+)	Enteritis, hämorrhag. Pneumonie
	N 352	6	– / 5	a.	hämorrhag. Oesophagits
	N 210	7	– / 5	a.	Septikämie, Enteritis, hämorrhag. Pneumonie
	N 379	9	– / 10	–	Pharynxödem, hämorrhag. Pneumonie, Ikterus
	N 377	10	– / 5-10	–	Septikämie, Hirnödem, Maulphlegmone
	L 28	10	– / 5-10	–	Hämorrhag. Pneumonie, Ikterus

* Tag des Leukozytenanstiegs (≥ 350/mm^3); ein Thrombozytenanstieg (≥ 40 000/mm^3) erfolgte bei Überlebenszeiten < 1 Monat nicht

** Verdauungskanal: – nein (+) sehr leicht + leicht ++ mäßig schwer +++ schwer ? fraglich Oes. = Oesophagus; Mag. = Magen; Duo. = Duodenum; Jej. = Jejunum; Ile. = Ileum; Caec. = Caecum; Col. = Colon; Rec. = Rectum; a. = Auswertung steht aus

brachen blutig auf, bei 3 von 11 Hunden kam es *spontan* zu einer *Hämatom*bildung im Operationsgebiet des Shunts. Alle gestorbenen Hunde hatten spätestens ab Mitte der ersten Woche p.TP *täglich Thrombozytensubstitutionen* benötigt; für die überlebenden Hunde wurden durchschnittlich 14 Transfusionen (9 - 20) durchgeführt. Ein Hämatokrit ⩽ 35 lag bei 2 Hunden (N 270, L 360) in der 7. - 9. Woche bzw. 10.Woche vor, 2 weitere Hunde mit minimalen KM- bzw. BC-Zelldosen (N 255, N 433) waren ab der 3./4.Woche nach FGKB über anderthalb Monate *schwer anämisch* ohne erkennbare Blutungen (HK 15 - 35).

Der *Tod* bei 26 Hunden war durch unzureichende Hämopoese, Infektionen und Butungen bedingt (Tab. 14). Das Knochenmark von 19 Hunden (gestorben innerhalb von 10 Tagen) war stark hypozellulär (< 5 - 10 % der Norm). Die KM-Zellularität von 7 Hunden, die über eine Woche bis zu einem Monat überlebten, betrug zwischen 10 und 50 %, wobei in 5 Hunden keine Megakaryozyten, in den anderen 2 (Hunde N 214, N 259) eine stark verminderte Thrombozytopoese gefunden wurden. Erythropoese und Granulopoese waren in allen Fällen der Knochenmarkrepopulation (vergl. 3.9.) vorhanden. Schleimhautdysplasien im Verdauungskanal wurden – wenn überhaupt – geringgradig und auf Oesophagus und/oder Dünndarm beschränkt gefunden. Für die 9 gestorbenen Hunde im *„mittleren" KM-Zelldosisbereich* betrug die mediane Überlebenszeit 7 Tage. Blutungen traten besonders im Myokard und Herzbeutel sowie Pleura (6 Hunde), Lungenparenchym (7 Hunde), infarktartig in der Nierenrinde (2 Hunde), am Zungengrund mit Ödembildung (2 Hunde) und im Magen-Darm-Kanal einschließlich Oesophagus (alle Hunde) auf . Hämorrhagisch- katarrhalische Enteritiden zeigten ihre stärkste Ausprägung im Duodenum und Colon. Eine hämorrhagische Gastritis wiesen die Hunde D 44 und D 34 auf. Beim letzteren sowie beim Hund D 72 war die Kachexie durch ein massives Zungengrundödem, beim Hund L 42 durch eine eitrige, nekrotifizierende Oesophagitis bedingt. Schwere, akute, z.T. hämorrhagische Entzündungen wurden auch in der Lunge (D 67), in der Niere (D 72) und Tonsillen (D 34, möglicher Sepsisherd) gefunden. Herzblutkulturen bestätigten in 4 Fällen eine Sepsis, an Keimen wurden E.coli oder Klebs.aerogenes nachgewiesen. Im *„niedrigen" KM-Zelldosisbereich* lag die mediane Überlebenszeit bei 5 Tagen. Die Todesursachen lagen auch hier in der erhöhten Blutungsbereitschaft – in Schwere und Lokalisation mit der vorher beschriebenen weitestgehend übereinstimmend – und Infektionen. Fast alle Hunde wiesen profunde Maulmucositiden und hämorrhagische Pneumonien auf, erschwert durch Kehlkopf-, Tracheal- und Lungenödeme. Eine bakterielle Allgemeininfektion war in der Hälfte der Fälle aufgetreten bei gleichem Keimnachweis. Die mediane Überlebenszeit der gestorbenen Hunde mit *BC-Transplantat* trifft mit 6 Tagen die Mitte der vorher angegebenen Werte. Für die hämorrhagische Diathese als Todesursache fiel die vergleichsweise stärkere Beteiligung des Lungenparenchyms (7 Hunde) auf mit einhergehender leichter bis mäßig schwerer Entzündung (6 Hunde) und Ödembildung (5 Hunde). Der Schwerpunkt des Infektionsgeschehens lag jedoch im Verdauungstrakt einschließlich schwerer, ulzerierend-nekrotischer Oesophagitiden, z.T. mit Pharynxbeteiligung. Eine Septikämie mit erwähnten Krankheitserregern wurde bei 3 der 9 Fälle festgestellt.

Von den 8 Hunden, die die akute Strahlenkrankheit trotz reduzierter Zelldosen im Transplantat *überlebten*, wurde einer (N 292) nach 5 Monaten wegen chronischen Hustens, ein weiterer (D 70) wegen Platzmangels 7 Monate p.TP getötet (Tab. 15). Die Autopsie von Hund N 292 ergab den

Tab. 15: Autopsiebefunde in Hunden, die das akute Strahlensyndrom überlebten (Stand: Jan. '81)

Bestrahlung	Hund Nr.	Überlebens-zeit (Monate)	Körpergewicht(kg) vor GKB – Ende (bzw. p.TP)^{x}	Pankreasbefund (Dystrophie und Fibrose)	Weitere Befunde
1600 R (Einzel-dosis)	D 43*	7	16,1 - 16,4 (1 Monat)	–	Herde chronischer Pneumonie mit Fibrose: + interstitielle Nephritis: (+)
	D 42*	8	12,2 - 12,7 (")	++	herdförmige Pleurafibrose: (+)
	D 36*	8	13,9 - 14,0 (")	–	–
	D 39*	21	12,1 - 14,5	–	–
2400 R (fraktioniert über 7 Tage)	D 64**	2	12,8 - 12,5		mononukleäre Myelomeningoenzephalitis
	L 40	2	10,4 - 10,6 (1 Monat)	++	miliare Nekroseherde in der Leber (Impf-schaden) / Maulschleimhautgeschwüre: +++
	N 292**	5	11,2 - 11,7	–	Wurmpneumonie mit Pleuraschwielen
	L 361*	5	8,9 - 8,5	–	herdförmige Pleurafibrosen Granulomenzephalitis: (+)
	D 70*	7	9,7 - 9,5	–	lympho-histiozytäre Infiltrate in Leber und Lunge: + / herdförmige Pleurafibrosen: (+)
	D 61*	10	12,6 - 15,0	+	Wurmlarven in der Lunge / herdförmige Pyelitis: (+)
	D 62*	10	12,2 - 12,5	+ bis ++	lymphohistiozytäre Infiltrate in der Leber herdförmige Pyelitis: (+)
	D 63*	10	12,6 - 12,6	+ bis ++	sonst o.b.B.
	D 71***	24	10,4 - 11,5 (17 Monate)		keine Autopsie
	N 270	38	12,0 - 13,5 (25 Monate)	++	Autointoxikation infolge übergangener Geburt 2 Früchte (♂u.♀): mazeriert, emphysematös, SSL 18 cm
2400 R / 5 Tage	N 323***	32	17,3 - 15,3	+	Autopsie durchgeführt; Auswertung steht aus

– negativ (+) sehr leicht (fraglicher Krankheitswert) + leicht ++ mäßig schwer +++ schwer x Endgewicht nicht ermittelt * getötet wegen Platzmangels in klinisch gesundem Zustand ** getötet im kranken Zustand *** Tod infolge Beißerei

Befund einer Wurmpneumonie und Pleuraschwielen, beim Hund D 70 wurden herdförmige Pleurafibrosen geringer Ausprägung und vereinzelt kleine lympho-histiozytäre Infiltrate in Leber und Lunge festgestellt. Die Hündin N 270 starb 38 Monate p.TP an einer Autointoxikation infolge

übergangener Geburt, sie war unbemerkt gedeckt worden. Ein vierter Hund starb 2 Jahre p.TP an den Folgen einer Beißerei, er wurde nicht seziert. Die übrigen 4 Hunde wurden zusammen mit den anderen überlebenden Tieren der Versuchsgruppe B (Tab. 16) von den modernen Käfiganlagen der GSF in eine Hundepension auf einem älteren Bauernhof mit freiem Auslauf verbracht.

Tab. 16: Überlebende Hunde aller Versuchsgruppen (Stand: Januar 1981) – Laparoskopie, Gewichtsentwicklung und Langzeitbeobachtung

Bestrahlung (Schema)	Hund Nr.	Überlebenszeit (Monate)	Pankreasdystrophie** laparoskop. Befund (Monate p.TP)	Körpergewicht (kg) vor GKB – z.Ztp. der Laparskopie (n)	Alter (Jahre)
1600 R	N 568	17	n.d.		2 3/4
(Einzeldosis)	N 583	17	n.d.		2 1/2
2400 R	D 68	43	nein (13)	13,2 - 14,3	4 3/4
(fraktioniert	L 41	43	ja (14)	10,2 - 13,2	4 1/2
über 7 Tage)	N 322	41	ja (14)	10,5 - 11,5	4 1/2
	L 360	41	nein (13)	10,1 - 10,0	5 1/2
	N 255	38	nein (10 1/2)	17,7 - 18,6	5 1/4
	N 433	28	fraglich (7 und 12)	15,5 - 16,8* und 16,2*	3 3/4
	D 58	28	nein (7 und 12)	15,0 - 12,7 und 13,0	5 1/4
2400 R /	N 369	36	ja (9 und 14)	16,6 - 17,9* und 17,0*	4 1/2
5 Tage	L 373	31	nein (6 1/2 und 13)	12,2 - 13,6 und 12,4	5 1/2
	N 241	28	ja (4 und 12)	15,9 - 15,8* und 16,9*	5 1/4
	N 445	26	nein (5)	12,7 - 12,3	3 3/4
	N 501	24	ja (3 1/2 und 6 1/2)	14,5 - 14,5* und 15,7*	3 3/4
	N 511	24	fraglich (4 und 7)	16,1 - 16,5* und 18,0*	3
2400 R /3 Tg.	N 262	29	ja (2 1/2 und 12)	18,4 - 15,3* und 17,5*	5 1/4

* unter Pankreasenzym-Substitution ** vergl. 3.8./3.9. n.d. = nicht durchgeführt

Die Versuchstiere überstanden den ökologisch einschneidenden Wechsel ohne jede Komplikation, sind munter und bei gutem Körpergewicht. Strahlenspätschäden wie Katarakt und Neoplasien oder andere degenerative und hypoplastische Gewebsveränderungen wurden klinisch bisher nicht beobachtet bei nunmehrigen Überlebenszeiten bis zu 3 1/2 Jahren. Dasselbe gilt auch für die 9 überlebenden Hunde aus den Gruppen A und D (Tab. 16), die z.Zt. noch in Neuherberg untergebracht sind.

5. Diskussion

Das Ziel der Untersuchungen war die Prüfung der Möglichkeiten der Ganzkörperbestrahlung mit höheren als bisher üblichen Dosen im Hund als Behandlungsmodell. 2400 R stellt das Doppelte der gebräuchlichen Standarddosis für die Knochenmarktransplantation bei Mensch (THOMAS et al., 1975 / 1977) und Hund (WEIDEN et al., 1975) dar. Die Einzeldosis von 1200 R entspricht beim Hund einer Körpermittedosis von ca. 9 - 10 Gy und ruft am Gastrointestinaltrakt bei Dosisleistungen unter 10 R/min lediglich reversible Schäden hervor (STORB et al.,1973, KOLB et al., 1979a).

Es wurden einerseits die Bedingungen der *hämopoetischen Rekonstitution* nach höheren Dosen untersucht, andererseits die Möglichkeiten zur Vermeidung akuter und chronischer Schäden durch *Protrahierung und Fraktionierung* geprüft.

5.1. Hämopoetische Rekonstitution

Die beschriebene Strahlensensibilität der hämopoetischen „Mikroenvironments" bzw. der Stromavorläuferzellen (2.1.) hatte erwarten lassen, daß die GKB mit 2400 R in 3 Fraktionen innerhalb von 7 Tagen oder weniger, die hämopoetische Rekonstitution durch AKMT hinsichtlich der Repopulation des Knochenmarks und des Anwachsens des Transplantates stark beeinflußt.

5.1.1. Knochenmarkstroma

Das Bestrahlungsschema entspricht einer über mehrere Wochen verabreichten konventionellen Radiotherapie von etwa 3000 rd in kleinen täglichen Dosen (ELLIS, 1968). Untersuchungen nach *Lokal*bestrahlungen bei Ratten (KNOSPE et a., 1966) und bei Patienten mit Hodgkin Krankheit (SLANINA et al., 1977) oder Brustkarzinomen (SYKES et al., 1974) wiesen über Monate und Jahre anhaltende Markaplasien in mit 2000 rd und mehr bestrahlten Knochen nach. Irreversibel war die Schädigung nach 4000 rd Lokalbestrahlung (SYKES et al. 1974).

In den vorliegenden Untersuchungen erfolgte eine *prompte* hämopoetische Rekonstitution nach Reinfusion genügender Anzahl KM-Zellen. Die Kinetik der Erholung peripherer Blutwerte war ähnlich der in Hunden, die gefrierkonserviertes Knochenmark nach tödlichen Dosen Dimethylmyleran (DMM) erhielten (KOLB et al., 1974). DMM ist ein lösliches Derivat von Busulfan, das nach TAVASSOLI et al. (1975) Knochenmarkstroma schont. Die KM-Histologie 2, 5, 7 und 10 Monate nach 2400 R-FGKB zeigte keine bestrahlungsbedingten Veränderungen.

Eine *akute* Störung des hämopoetischen „Microenvironments" kann auf Grund der Ergebnisse allerdings nicht ausgeschlossen werden, da nach GKB stimulierende, humorale Faktoren so sehr

überwiegen könnten (CHAMBERLIN et al., 1974), daß eine Störung nicht mehr nachweisbar ist. Andererseits kann diese mögliche Strahlenschädigung des hämopoetischen „Microenvironments" nach vorliegenden Beobachtungen nicht von ausschlaggebender Bedeutung sein. Die *chronische* Schädigung in Form einer Fibrose wurde nicht festgestellt. Die im Vergleich zur konventionellen Radiotherapie geringe Dosisleistung kann als Erklärung dienen (HUG et al., 1966), oder aber nach *Ganzkörper*bestrahlung mag die in eine Fibrose mündende Entzündungsreaktion, die bei lokaler Bestrahlung von unbestrahlter Hämopoese beeinflußt wird, unterdrückt sein. Morphologisch und funktionell war bei den Hunden trotz hochdosierter GKB eine „restitutio ad integrum" festzustellen. Selbst nach einer FGKB von 3600 R, gegeben innerhalb von 6 Tagen, und AKMT ist eine vollständige hämopoetische Erholung bei Hunden möglich (eigene Beobachtung).

5.1.2. Anzahl mononukleärer Zellen und determinierter Stammzellen im Transplantat

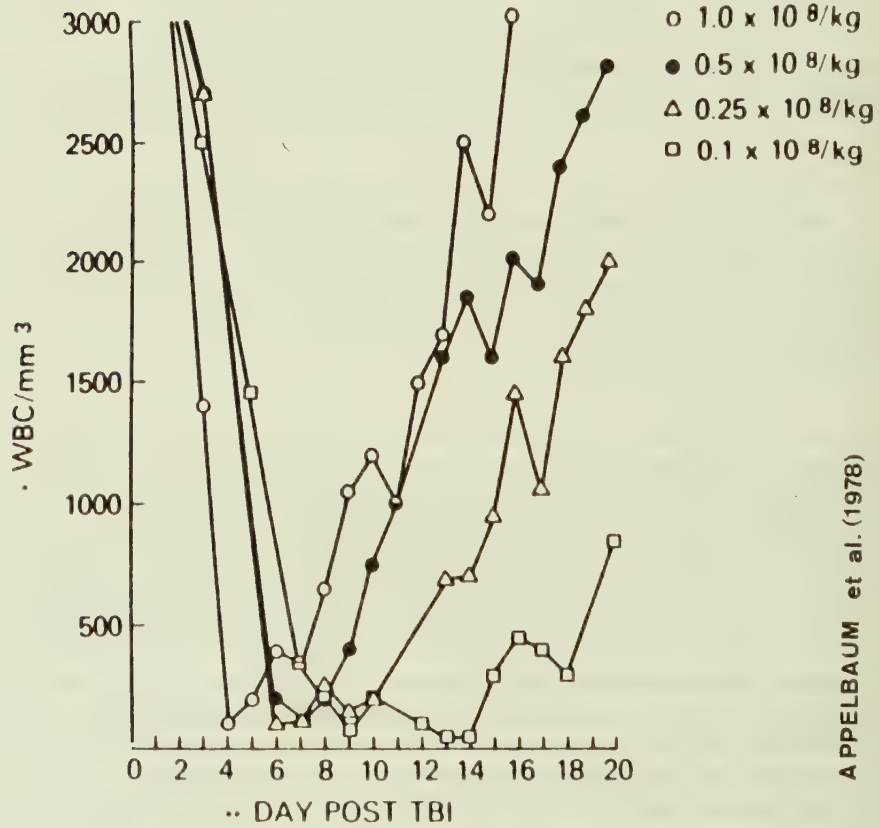
Bei Reinfusion *ausreichender* Anzahl gefrierkonservierter KM-Zellen erfolgte die Erholung peripherer Blutwerte nach fraktionierter 2400 R-GKB in gleichen Zeiträumen p.TP wie nach 1600 R kontinuierlicher Strahlenexposition (Abb. 2). Zur Untersuchung der Kinetik der hämopoetischen Rekonstitution nach hochdosierter FGKB wurde die Zelldosis im Transplantat *reduziert.*

5.1.2.1. Knochenmarkzellen

Die für ein Überleben (> 30 Tage) nach FGKB von 2400 R notwendige Anzahl Knochenmarkzellen stimmt annähernd mit den Werten überein, wie sie von GORIN et al. (1978) nach einer niedrigen Ganzkörperbestrahlungsdosis (9 - 10 Gy) angegeben werden (Tab. 1/3). Beim Vergleich zu den hier ermittelten Zellangaben in *mononukleäre* KMZ/kg KG ist ein Korrekturfaktor von 1,2 zu berücksichtigen, da GORIN et al. Angaben in *nukleäre* KMZ/kg KG machen (vergl. 3.2.1.). Bei Infusion von weniger als 1,5 x 10^7 autologer KM-Zellen/kg KG ergab sich in vorliegender Studie allerdings kein Langzeitüberleber. Doch die Repopulation des Knochenmarks bei 2 Hunden, die 1,1 x 10^7 bzw. 1,0 x 10^7 MKMZ/kg KG bekamen (Tab. 14), zeigt, daß selbst mit so geringen Knochenmarkmengen ein Überleben möglich sein dürfte, wenn eine intensive supportive Therapie angewandt wird. Im Vergleich zu den Untersuchungen von GORIN et al. (1978) wurde eine doppelt so hohe Bestrahlungsdosis (Tab. 6) angewandt bzw. das 5-fache der für den Hund tödlichen Dosis (Tab. 3). Mithin ist eine autochthone blutbildende Erholung selbst Monate nach Transplantation unwahrscheinlich. Darüber hinaus waren die Tiere durch die Fraktionierung der Bestrahlung schon zum Zeitpunkt der Transplantation panzytopenisch (Abb. 2/3). Ähnlich wie Patienten, die einer hochdosierten Chemo- und Radiotherapie unterworfen werden, benötigten alle Hunde in den ersten Wochen p.TP Thrombozytenkonzentrate und wegen hohen Fiebers

Antibiotika. Die gastrointestinale Toxizität war leicht und reversibel nach Reinfusion ausreichender Anzahl KM-Zellen (Tab. 13). Unter diesen Umständen ist der Zelldosisbereich, der ein Überleben aller Hunde ermöglichte, durchaus mit den Ergebnissen von GORIN et al. (1978) und APPELBAUM et al. (1978) vergleichbar, wobei der *zeitliche Ablauf* des Anstiegs der peripheren Leukozytenwerte je Zelldosisbereich (Abb. 13/4) die Parallelität bestätigt.

Abb. 13: Wirkung der Zelldosis auf den Ablauf der hämopoetischen Erholung – tägliche Leukozytenwerte (arith. Mittel) im peripheren Blut überlebender Hunde (APPELBAUM et al., 1978)



* Leukozyten/mm^3

** Tage nach GKB(^{60}Co bilateral; 9 - 10 Gy; 9 rd/min)

Kryokonservierte KM-Zellen/kg KG bei o 2 ● 11 ▲ 13 □ 3 Hunden

Der Thrombozytenanstieg (≥ 50 000/mm³) erfolgte nach APPELBAUM et al. (1978) mit Zelldosen von 1 x 10^8/kg KG gefrierkonservierten Knochenmarks durchschnittlich 21 Tage, mit 5 x 10^7/kg KG im Mittel 33 Tage und mit den minimalen Zelldosen spätestens 7 Wochen p.TP. Auch in diesen Blutwerten besteht Übereinstimmung in der abgestuften Verzögerung der Erholung je nach Zellzahl mit vorliegenden Ergebnissen (Abb. 5).

Der Vergleich mit *anderen* Ergebnissen der AKMT beim Hund nach niedriger GKB-Dosis bezüglich Überleben je reinfundierter Zellzahl (Tab. 1) ist problematisch, da gewichtsbezogene Angaben fehlen oder nur wenige Hunde untersucht wurden. VRIESENDORP et al. (1976) beschrieben bei 2 Hunden einen verzögerten Leukozytenanstieg (1000/mm³) 14 Tage nach 750 rd GKB und Reinfusion von 5,0 x 10^7/kg KG gefrierkonservierter KM-Zellen, was vorliegenden Ergebnissen entspricht (Abb. 4). Die Studien von ALPEN et al. (1958), MANNICK et al. (1960a) und CAVINS et al. (1962) ergaben eine stark reduzierte 30 Tage-Überlebensrate nach Reinfusion von 100 - 145 x 10^7 KM-Zellen je Hund bei Körpergewichten von 5 - 15 kg; danach liegen die *minimalen* Zellzahldosen etwas höher als die hier ermittelten. SULLIVAN et al. (1959) dagegen fanden bei 7 von 8 Hunden eine hämopoetische Rekonstitution nach 400 R GKB und Reinfusion von nur 24 - 64 x 10^7 KM-Zellen je Hund mit Körpergewichten von mindestens 5 kg, dabei waren allerdings autochthone Erholungsvorgänge möglich, wie ein Kontrolltier (ohne AKMT) beweist (Tab. 3).

Da der Anstieg der peripheren Blutwerte bei Hunden, die mehr KM-Zellen bekommen hatten, schneller erfolgte (Abb. 4/5/6), war es von größerer Bedeutung, eine *optimale* Knochenmarkzelldosis zu ermitteln als die Minimaldosis zu bestimmen. Die Optimaldosis dürfte als die niedrigste Anzahl KM-Zellen, die den frühest möglichen Anstieg von Leukozyten und Thrombozyten bewirkt, definiert sein, weil das Überleben vom kontrollierbaren Umfang und der Dauer des Infektionsgeschehens und der Blutungsneigung abhängt. Die KM-Zellularität als Maßstab allein, wie von CALVO et al. (1976) vorgeschlagen, scheint weniger aussagekräftig, weil einige Hunde infolge ungenügender Hämopoese starben trotz fortgeschrittener Repopulation des Knochenmarks (Tab. 14). In den vorliegenden Untersuchungen betrug die optimale Anzahl mononukleärer KM-Zellen etwa 1 x 10^8/kg KG (Abb. 7) – höhere Zelldosen bewirkten keine schnellere Erholung (Abb. 7 / Tab. 11). Suboptimale Zelldosen dagegen wirkten sich noch 2 - 3 Monate nach Transplantation auf das Blutbild der Hunde aus, wobei sich besonders die vollständige Erholung der Lymphozyten auf Ausgangswerte verzögerte (Abb. 5).

SCHÄFER et al. (1974) ermittelten eine Dosis von 4 x 10^7 gefrierkonservierten KM-Zellen/kg KG als ausreichend für Rhesusaffen, und CHERTKOV et al. (1971) 2 x 10^8 frische KM-Zellen/kg KG als Mindestdosis für Paviane. GORIN et al. (1977) zeigten, daß sich ein Patient mit akuter Leukämie nach Transplantation von nur 5 x 10^7 autologer KM-Zellen/kg KG erholen konnte.

Vorliegende Resultate bestätigen die anderer Autoren (Tab. 1), daß 5×10^7 mononukleäre KM-Zellen/kg KG für eine vollständige hämopoetische Rekonstitution notwendig sind. Des weiteren wurde gezeigt, daß eine 2400 R - GKB, fraktioniert innerhalb von 7 Tagen, weder die *Kinetik* der hämopoetischen Erholung noch die *Anzahl benötigter Knochenmarkzellen* ändert.

Die notwendige Anzahl der CFU_C's im Transplantat wurde mit über 30×10^3/kg KG ermittelt. Dieses stimmt mit Untersuchungen beim Beagle nach 1200 R Einzeit - GKB überein, wobei – unter Berücksichtigung der relativ großen Schwankungsbreite dieses Stammzellnachweises – 1×10^5 CFU_C/kg als optimal angesehen werden (GERHARTZ et al., 1980). Letztlich ist die hämopoetische Erholung von der Anzahl infundierter *pluripotenter* Stammzellen abhängig. Sie sind gegenwärtig nicht mit in vitro-Methoden bestimmbar. Der Anteil *determinierter* Stammzellen (CFU_C) dürfte in solchen Fällen ein besserer Anhalt für das hämopoetische Potential eines Transplantates sein als die Anzahl mononukleärer KM-Zellen, wenn nur „suboptimale" Zellmengen zu gewinnen sind. Die Anzahl mononukleärer KM-Zellen selbst sollte um die Anzahl mononukleärer Blutzellen im entsprechenden Volumen (= Volumen des Aspirats abzüglich Mediumanteil) korrigiert werden.

Diese (modifizierte) Korrekturmethode (vergl. 3.2.1.) scheint vorteilhafter gegenüber der von THOMAS et al. (1970 b) vorgeschlagenen, die *alle* nukleären Zellen in die Korrektur einbezieht und somit unberücksichtigt läßt, daß im Blut der Prozentanteil *mono*nukleärer Zellen an der Gesamtzellfraktion in der Regel um ein mehrfaches geringer ist als im Knochenmark. Dadurch wird die Korrektur unverhältnismäßig groß. Der Unterschied ist für die KM-Entnahme bei gesunden, unbehandelten Versuchstieren nicht gravierend, während er bei der Gewinnung hämopoetischer Zellen aus einem hypozellulären Knochenmark mit unvermeidlich größerer Blutbeimengung bedeutender wird. Hier angegebene Zellzahlen für das KM-Transplantat sind also um die größtmögliche „Beimengung" mononukleärer Blutzellen (vor allem Lymphozyten) korrigiert, deren CFU_C-Gehalt etwa nur 1/5 - 1/10 im Vergleich zum Knochenmark beträgt (DEBELAK-FEHIR et al., 1975).

5.1.2.2. Periphere Leukozyten

Das Vorkommen zirkulierender hämopoetischer Stammzellen im peripheren Blut ist seit langem durch in vitro- (GOODMAN et al., 1962) und in vivo-Untersuchungen (Tab. 2) belegt. Sie befinden sich unter den mononukleären Leukozyten (HERBST et al., 1975) bzw. Lymphozyten (BARR et al., 1975; VAN NOORD et al., 1972).

Die *Leukapherese* hat gegenüber der multiplen KM-Aspiration in Allgemeinnarkose den Vorteil, daß sie ohne große Belastung für den Spender in kurzen Abständen wiederholt werden kann. Darüber hinaus besteht im „präklinischen Modell" die Möglichkeit, durch Vorbehandlung mit Dextransulfat (VAN DER HAM et al., 1977) oder Pyran-Copolymer (ZANDER et al., 1980), die

Zahl der zirkulierenden Stammzellen zu vermehren und somit die Ausbeute während einer Leukapherese zu erhöhen. Hier wurde auf die Konzentrierung der hämopoetischen Zellen durch Mobilisation aus dem Knochenmark verzichtet, da die Unbedenklichkeit der klinischen Anwendung genannter Stoffe nicht geklärt ist. Es mußten daher zur Gewinnung größtmöglicher Mengen mononukleärer Leukozyten mehrere Pheresen durchgeführt und bei einigen Hunden nach ausreichender Erholungsphase ein zweiter arteriovenöser Shunt zur erneuten Blutzellsammlung eingesetzt werden, was zu unterschiedlich langen Konservierungszeiten des „Buffycoats" führte (vergl. 3.2.2.).

Ziel der Untersuchung war es, die Anzahl Blutzellen zu ermitteln, die zur hämopoetischen Rekonstitution nach 2400 R GKB erforderlich sind, und sie in Relation der notwendigen Knochenmarkmenge zu setzen. 11 Hunde erhielten zwischen 19,1 und 117,1 x 10^7 mononukleärer Leukozyten/kg KG (Tab. 9). Zwei Hunde überlebten mit Erholung ihrer Blutwerte. Neun Hunde starben zwischen 4 und 10 Tagen p. TP mit Blutungen, Infektionen und Zeichen einer Strahlenschädigung des Darmes, bei 3 Hunden wurde eine beginnende Repopulation des Knochenmarks gefunden (Tab. 14). Die Ergebnisse bestätigen das Vorhandensein von pluripotenten Stammzellen in strömendem Blut (Tab. 2).

Die Ursache für die Mißerfolge bei einem Teil der Hunde liegt möglicherweise in der langen *Lagerungszeit der Leukozytenkonzentrate* in der Gasphase (-140°C) flüssigen Stickstoffs (-196°C). Mit in vitro-Untersuchungen zeigten O'GRADY et al. (1969), daß Mäuseknochenmark noch nach zwei Jahren Gefrierlagerung 80 % der Viabilität von KM nach Kurzzeitkryokonservierung aufwies. MELANIN et al. (1974) prüften die Lebensfähigkeit von KM nach 3-jähriger Gefrierkonservierung mit DMSO nach morphologischen Kriterien und fanden sie zu 90 % erhalten. RAGAB et al. (1974) dagegen beschrieben, daß menschliches Knochenmark nach 4-monatiger Gefrierkonservierung gegenüber frischen KM nur noch 50 % Kolonien in semisolidem Agar bildet (CFU_C-Ansatz). Bei in vivo-Studien an der Maus ermittelten PHAN et al. (1963) das Restaurationsvermögen hämopoetischer Zellen je Lagerungstemperatur: unvermindert nach 2 1/2 Jahren bei -196°C, Verlust der Lebensfähigkeit innerhalb 12 Monaten bei -79°C und bei -30°C innerhalb 4 Wochen. Die hämopoetische Erholung eines von THOMAS et al. (1962) beschriebenen Hundes nach 1000 R GKB und Reinfusion von 410 x 10^7 KM-Zellen, die für 14 Monate bei -80°C gelagert worden waren (Tab. 1), dürfte demnach auf die sehr hohe Anzahl reinfundierter Zellen zurückzuführen sein. NOTHDURFT et al. (1977) injizierten 32 bis 163 x 10^7 autologe BC-Zellen/kg KG nach bis zu 18-monatiger Lagerung bei -196°C in 8 Hunden nach 1200 R GKB, wobei ein Hund mit der sehr niedrigen Anzahl von 47 x 10^7/kg ohne Granulozytenanstieg verstarb (Tab. 2). Mit einer konstanten Zellzahl von 5,0 x 10^7 autologen KM-Zellen/kg KG behandelte APPELBAUM (1979) ganzkörperbestrahle Hunde 9, 12 und 18 Monate nach KM-Entnahme: die Überlebensrate war um 30 %, 70 % und 100 % reduziert (Tab. 1). GORIN et al. (1978) ermittelten unter gleichen Bedingungen beginnende Zellschädigung ab 5 Monate Kryokonservierung. In beiden Studien wurde das hämopoetische Zellmaterial – wie hier – in der Gasphase flüssigen Stickstoffs gelagert.

Somit sind die Hunde N352, N377, N210 und N212 nur bedingt auswertbar. Es war also ein Überleben mit Blutstammzellen nur nach Reinfusion von $> 70 \times 10^7$ mononukleären BC-Zellen/kg KG möglich und das *Verhältnis zur Anzahl mononukleärer KM-Zellen,* die eine gleiche Erholungsrate peripherer Blutwerte bewirkten, betrug 20 bis 50 : 1. Diese Korrelation deckt sich mit den Zelldosisuntersuchungen (Tab. 2/1) von APPELBAUM (1979) und GORIN et al. (1978). Nach DEBELAK-FEHIR et al. (1975) sowie ROSS et al. (1976) beträgt im Hund das Verhältnis von granulozytär/monozytär-determinierter Stammzellen im Knochenmark zu den CFU_C's unter den mononukleären Blutleukozyten 5 bis 10 : 1. Die Diskrepanz zwischen in vivo- und in vitro-Bestimmung läßt auf eine myelopoetische „Minderwertigkeit" der Blutstammzelle schließen. MICKLEM et al. (1975) wiesen mittels CFU_S-Technik ein reduziertes Potential der zirkulierenden Stammzelle zur Selbstreproduktion nach. Diese Autoren folgern, daß Blutstammzellen als „abgeschobene" Überproduktion des Knochenmarks aufgefaßt werden können.

Andererseits bewirkte der „Buffycoat" gegenüber Knochenmark in äquivalenter Zelldosis eine schnellere *Erholung der Lymphozytenwerte* nach GKB, was auch von APPELBAUM (1979) beobachtet wurde. Danach liegt es nahe, die Qualität eines KM-Transplantats durch BC-Zellen zu verbessern. Ein möglicher theoretischer Vorteil wäre die schnellere Immunrekonstitution.

5.2. Strahlenkrankheit

Bei der Fraktionierung der 2400 R-GKB zur autologen KMT wurden zwei Einzeldosen von 600 R und 1200 R am letzten Bestrahlungstag gewählt. 600 R (ca. 450 - 500 rd) führen beim Hund zur tödlichen Knochenmarkaplasie (THOMAS et al., 1970 a) ohne klinisch erkennbare gastrointestinale Toxizität (VRIESENDORP et al., 1980).

5.2.1. Akute gastrointestinale Toxizität

Bei Verabreichung der Bestrahlungsfraktionen in drei- oder zweitägigem Abstand und AKMT bildete sich das gastrointestinale (GI-)Syndrom zurück (Abb. 11). Kürzere Intervalle wie bei der täglichen Bestrahlung zeigten eine wesentlich geringere Schonung der Schleimhaut im Verdauungskanal (Tab. 12). Das beweist, daß der Fraktionierungseffekt im wesentlichen auf der Repopulation des geschädigten Gewebes *(Regeneration)* in den Bestrahlungspausen und nicht auf der intrazellulären Erholung (Restitution) beruht, die innerhalb weniger Stunden abgeschlossen ist (WITHERS, 1975; DUTREIX et al., 1979). Die Fraktionsdosis von 600 R liegt im proportionalen Teil der Dosiswirkungskurve (vergl. Abb. 1), während die „Schulter" den Bereich des Strahlenschadens angibt, in dem wesentliche Erholungsvorgänge durch zelluläre Reparation auftreten (ELKIND, 1977). Auf die Überlebensrate bezogen, zeigen die Ergebnisse nach 2400 R-GKB, fraktioniert innerhalb von 72 Stunden, eine (zumindest) gleich hohe Mortalität auf Grund des GI-Syndroms wie nach kontinuierlicher Exposition (Tab. 3), d.h. die Fraktionierung erbrachte keinen Vorteil.

Bei zwei- und dreitägiger Bestrahlung erstreckten sich Erbrechen und Durchfälle über einen längeren Zeitraum als nach der hochdosierten Einzeitbestrahlung, die Diarrhoen waren jedoch weniger ausgeprägt bzw. die Anzahl betroffener Hunde geringer. Eine weitere Reduzierung der gastrointestinalen Toxizität wäre wahrscheinlich erreichbar bei Verminderung der Darmkeime durch orale Dekontamination mit schwer resorbierbaren Antibiotika ab Bestrahlungsbeginn. Die erhöhte Strahlentoleranz speziell pathogenfreier (VAN BEKKUM et al., 1967) und keimfreier (REYNIERS et al., 1956) Nager ist bekannt.

5.2.2. Infektionen und Blutungen

Durch Bestrahlungspausen von 2 Tagen wurde einerseits die Darmschleimhaut stärker geschont, andererseits verlängerte sich die *leukozytopenische* Phase für die Versuchstiere. Sie fand klinisch einen deutlichen Ausdruck in Stomatitiden, die therapeutisch kaum zu beeinflussen waren. Die schleierartigen, schmutzig-grauen Beläge deuteten auf eine – zunächst reaktionslose – pseudomembranöse Entzündung krupöser Art; bei Verlängerung der agranulozytären Phase (reduzierte Zellzahl im Transplantat) bildeten sich torpide Geschwüre bzw. Verschorfungen in der ganzen Tiefe der Schleimhaut, wenn im betroffenen Hund keine Erholung der Leukozytenwerte erfolgte. Der Vorgang war somit von der Qualität des Transplantats beeinflußt, entsprechendes gilt für Veränderungen anderer Schleimhäute wie Rhinitis und Konjunktivitis, für die gastrointestinale Toxizität (Tab. 13) und die Länge der Fieberphasen (Abb. 11). Ähnlich korrelierte das Ausmaß der hämorrhagischen Diathese mit der Länge der *thrombozytophenischen* Phase – Blutungen und Infektionen bzw. Septikämien in sich ergänzendem Ablauf als Todesursachen waren die Regel nach Reinfusion ungenügender Anzahl hämopoetischer Zellen (Tab. 14). Die insgesamt schwächer ausgeprägte Symptomatik nach Einzeitbestrahlung hat neben der kürzer auftretenden Leuko- und Thrombozytopenie einen wesentlichen Grund darin, daß die betroffenen Zeiträume sich nicht überschnitten. Andererseits zeigen die Versuche, daß eine täglich zweimalige antibiotische Behandlung und intensive Unterstützungstherapie mit Blutkomponenten einen etwa gleich guten Erholungsablauf nach hochdosierter FGKB mit 2400 R ermöglichen wie nach 1600 R-Einzeitbestrahlung.

5.2.3. Chronische Veränderungen und Spätschäden

31 Hunde überlebten das akute Strahlensyndrom mit vollständiger hämopoetischer Rekonstitution (Tab. 15/16). Zehn Hunde mußten leider wegen Platzmangels zwischen 5 und 21 Monaten nach AKMT getötet werden, zwei Hunde wurden wegen Krankheit euthanasiert und 4 Hunde starben 2, 24, 32 und 38 Monate p. TP (Tab. 15). Neben Pankreasfibrosen leichten bis mäßigen Grades wurden kleinere Infiltrate von Lymphozyten und Histiozyten in Gehirn, Lunge und Leber gefunden. Sie dürften auf der Invasion von Wurmlarven beruhen – generell besteht eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Infektionen jeder Art nach Ganzkörperbestrahlung. Als Strahlenfolge

könnten die subpleuralen Fibroseherde leichten Grades angesehen werden. Pneumonien wurden nicht nachgewiesen, wobei eine besondere Strahlenresistenz der Lunge des Hundes unwahrscheinlich ist.

Gewichtsverluste und verzögerte Gewichtszunahmen traten bei Hunden aller Versuchsgruppen auf. Die Malresorption als Ursache kann hepatogen, pankreatogen oder durch Malabsorption im Darm bedingt sein. Eine Pankreasdystrophie wurde in fast der Hälfte der überlebenden Hunde laparskopisch nachgewiesen. Die makroskopischen Befunde korrelierten nicht immer mit der Gewichtsentwicklung (Hunde N369, L41, D58), die Pankreasenzymsubstitution war in einigen Fällen (Hunde N241, N501) erfolglos. NACCHIERO et al. (1978) beobachteten nach Lokalbestrahlung der Bauchspeicheldrüse von Hunden mit 2400 rd eine Abnahme des Sekretionsvolumens ab 6. Woche nach Bestrahlung mit Reduktion um 60 % in der 8. Woche und über 90 % 4 Monate nach Strahlenexposition, der Ausstoß von Enzymproteinen war ähnlich stark reduziert. Morphologisch wiesen die Autoren eine diffuse interstitielle Fibrose des Organs nach. In den vorliegenden Untersuchungen sind die Auswertungen der Pankreasbiopsieproben (vergl. 3.8.), von Stuhlgewichtskontrollen und der Ergebnisse von Bestimmungen der Serumanalyse und -lipase nicht einbezogen, die einen Vergleich ermöglichen werden.

Ansonsten beschränkten sich die Beobachtungen in bis zu 3 1/2 Jahren nach GKB auf die strahlenbedingte Poliosis unterschiedlicher Ausprägung bei allen Hunden. Nach Erfahrungen in der hochdosierten konventionellen Strahlentherapie ist eine Langzeitbeobachtung auf Strahlenspätschäden über weitere Jahre (RUBIN et al., 1972) notwendig.

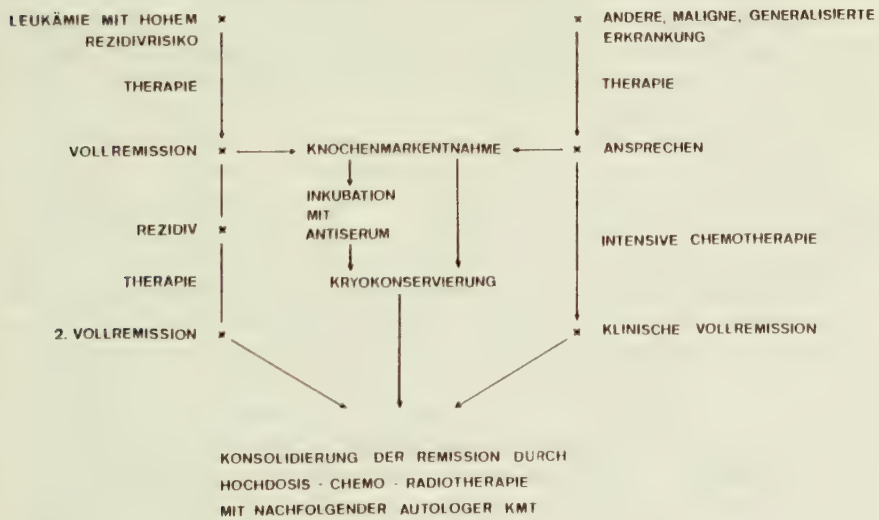
5.3. Bedeutung der tierexperimentellen autologen Stammzelltransplantation nach Ganzkörperbestrahlung

Die *Grundlagen* der Knochenmarktransplantation (KMT) wie die Charakterisierung hämopoetischer Stammzellen und immunologische Reaktionen bei Transplantation zwischen genetisch unterschiedlichen Individuen wurden bevorzugt in der Maus erforscht (zusammenfassende Darstellung: THIERFELDER, 1975). So wurde an einem Mäusestamm mit kongenitaler Anämie gezeigt, daß der ursächliche Defekt im „Microenvironment" durch KMT nicht behoben werden kann. Dagegen ist eine Stammzellschädigung wie bei der zyklischen Neutropenie „grauer Colliehunde" durch Transplantation hämopoetischer Zellen heilbar bzw. bei Übertragung kranken Marks auf gesunde Hunde eine zyklische Hämopoese feststellbar (WEIDEN et al., 1974). Enzymatische und chromosomale „Marker" wurden zur Unterscheidung von Empfänger- und Spenderzellen nach allogener KMT entwickelt (NOWELL et al., 1956; FORD et al., 1956). Für die autologe Knochenmarktransplantation (AKMT) nach hochdosierter Chemotherapie oder letaler Ganzkörperbestrahlung beruht der Nachweis des „Engraftments" auf dem Vergleich der Kinetik der hämopoetischen Rekonstitution bzw. der Überlebensrate von Tieren mit und ohne Reinfusion

hämopoetischer Zellen. In vorliegenden Untersuchungen an Hunden wurde ein „indirekter" Nachweis mit der unterschiedlichen Geschwindigkeit der hämopoetischen Erholung je Anzahl transplantierter Zellen – oder ihr Ausbleiben nach Reinfusion extrem geringer Zellmengen – geführt; ein weiterer Vergleich mit unbehandelten Kontrollen (ohne AKMT) nach 2400 R FGKB erschien nicht notwendig.

Die am Hund über Jahre (Tab. 1 - 3) erarbeiteten *Techniken* der KM-Entnahme, Separation und Kryokonservierung sowie Therapiepläne trugen wesentlich zur Anwendungsweise der KMT beim Menschen bei (THOMAS et al., 1975). Die autologe KMT zur hämopoetischen Rekonstitution nach hochdosierter Chemo- und Radiotherapie kann grundsätzlich bei jedem Patienten – Leukämien, Lymphome,solide Tumoren (SPITZER et al., 1980) – durchgeführt werden (Abb. 14). Dabei ist jedoch die Vermeidung der Reinfusion von Tumorzellen ein wesentliches Problem; des wei-

Abb. 14: Behandlungsplan der autologen Knochenmarktransplantation



teren ist unklar, wieviel mononukleäre KM-Zellen bzw. CFU_C's von einem zytostatisch vorbehandelten Patienten entnommen werden müssen, um ausreichende Mengen pluripotenter Stammzellen für die AKMT einzufrieren. Eine Elimination von Leukämiezellen im Transplantat könnte mithilfe spezifischer Antiseren erfolgen (THIERFELDER et al., 1977), die restaurative Wirksam-

keit bleibt nach Inkubation erhalten (NETZEL et al., 1980). Die ermittelte Abhängigkeit der Erholung peripherer Blutwerte je transplantierter KM-Zellen bei gesunden, unbehandelten Hunden (Abb. 7) könnte in Relation gesetzt werden zur Kinetik der Rekonstitution von Hunden, bei denen die KM-Entnahme nach zytostatischer Vorbehandlung erfolgt mit Reinfusion der „optimalen" Anzahl KM-Zellen nach 2400 R FGKB oder einer niedrigeren Einzeldosis (KOLB et al., 1981).

WEIDEN et al. (1979) beschrieben signifikant verlängerte (z.T. anhaltende) Remissionen in Lymphosarkomhunden nach hochdosierter Kombinationschemotherapie, *Ganzkörperbestrahlung* mit 1100 R und AKMT (im Mittel $1{,}3 \times 10^8$ nukleäre KM-Zellen/kg KG – um Blutwert korrigiert) gegenüber solchen, bei denen man sich auf die Chemotherapie beschränkte. Die medikamentöse Behandlung ist stärker von Stoffwechselvorgängen beeinflußt als die Ganzkörperbestrahlung, die dazu Leukämiezellen auch in „privilegierten" Regionen wie ZNS und Hoden eliminiert (THOMAS et al., 1975). Mit der am Hund ermittelten Standarddosis von ca. 10 Gy Körpermitteldosis und Cyclophosphamid wurde in einem Teil von Patienten mit reduzierten akuten Leukämien anhaltende Remissionen erreicht (THOMAS et al., 1977) – eine Erhöhung der Bestrahlungsdosis könnte eine Verminderung der Rezidivrate bewirken wie in Kindern mit akuter Lymphoblastenleukämie, bei denen nach zytostatischer Initialtherapie eine Hirnschädelbestrahlung erfolgte, altersabhängig mit einer Dosis von 1500 - 2400 rd (VAN LIEVEN, 1976; LAMPERT et al., 1977).

6. Zusammenfassung

Die autologe Knochenmarktransplantation (KMT), d.h. die Reinfusion des eigenen Knochenmarks nach Ganzkörperbestrahlung (GKB), erlaubt die Bestrahlung mit anderweitig tödlichen Strahlendosen. Sie ermöglicht hierdurch die Behandlung generalisierter, maligner Erkrankungen mit GKB. Die bisher verwendete GKB mit einer Einzeldosis von 1200 R-frei Luft (etwa 10 Gy) war bei Mensch und Hund zur Behandlung maligner, hämatologischer Krankheiten unzureichend. Aus diesem Grund wurde die autologe KMT nach höheren Strahlendosen im Hund untersucht.

Das *akute Strahlensyndrom* nach einer Einzeldosis von 1600 R (etwa 12 - 14 Gy) und nach 2400 R (etwa 18 - 20 Gy) fraktionierter Bestrahlung wurde in Abhängigkeit von der Fraktionierung und der Anzahl infundierter Knochenmarkzellen verglichen. Das akute Strahlensyndrom bestand vor allem in der Schädigung des Verdauungstraktes mit Erbrechen und Durchfall und in einer Schädigung der Hämopoese mit Aplasie des Knochenmarks sowie Panzytopenie des peripheren Blutes, die in Hunden, die ausreichende Mengen hämopoetischer Zellen erhalten hatten, vorübergehend war. Ferner wurden Veränderungen an der Haut mit Strahlenerythem und nachfolgender Schuppung und an den Schleimhäuten mit grauen Belägen und Ulcera im Maul, Rhinitis und Konjunktivitis beobachtet. Die Einzeldosis von 1600 R wurde mit einer Dosisleistung von 5,5 R/min verabreicht, die Hunde erhielten ihr kurz zuvor entnommenes frisches Knochenmark in ausreichender Menge (10,3 - 34,0 x 10^7/kg mononukleäre Zellen) unmittelbar nach der Bestrahlung zurück. Die fraktionierte Bestrahlung mit 2400 R wurde mit 1200 R innerhalb von 24 Stunden vor KMT und zwei zusätzlichen Fraktionen von je 600 R entweder am 2. und 3. Tag vor KMT oder am 3. und 5. Tag vor KMT oder am 4. und 7. Tag vor KMT verabreicht. Die Dosis von 1200 R entspricht der bisher angewandten Standarddosis, die lediglich ein leichtes, reversibles gastrointestinales Strahlensyndrom hervorruft; diese Fraktion wurde immer mit einer Dosisleistung von 5,5 R/min gegeben. Die Dosis von 600 R führt im Hund in allen Fällen zum Tode infolge Knochenmarkversagens, ohne ein klinisch erkennbares gastrointestinales Syndrom zu induzieren; 600 R-Fraktionen wurden beim 7-Tage-Schema und in einem Teil der während 5 Tagen bestrahlten Hunde mit einer Dosisleistung von 0,5 R/min, in anderen Fällen mit 5,5 R/min appliziert. Das reinfundierte Knochenmark war bei diesen Hunden 2 - 14 Wochen vor der KMT entnommen und in tiefgefrorenem Zustand (-140°C) aufbewahrt worden. Nach 1600 R Einzeitbestrahlung überlebten die Hunde, Leukozytopenie und Thrombozytopenie waren von kurzer Dauer, Erbrechen und Durchfälle traten bei allen Hunden in der ersten Woche bzw. Ende der ersten/Anfang der zweiten Woche auf, Schleimhautveränderungen im Maul wurden nicht beobachtet. Die fraktionierte Bestrahlung mit 2400 R innerhalb von 3 Tagen führte zu schwerem Erbrechen, blutig-wäßrigen Durchfällen und Exsikkose, die nur einer von vier Hunden überlebte. Die gleiche Dosis,innerhalb von 5 Tagen,gegeben führte zu einem akuten Strahlensyndrom mäßig schweren Ausmaßes, 7 von 8 Hunden überlebten. Es war kein Unterschied festzustellen, ob die 600 R-Fraktionen

mit einer Dosisleistung von 5,5 R/min oder 0,5 R/min gegeben wurden. 2400 R, innerhalb von 7 Tagen gegeben, riefen Erbrechen und Durchfälle nur leichten bis mäßigen Ausmaßes hervor, allerdings kam es zu lange anhaltender Leukozytopenie und Thrombozytopenie sowie ausgeprägten Schleimhautveränderungen im Maul. Die Hunde überlebten. Hunde, die nach fraktionierter GKB mit 2400 R innerhalb von 7 Tagen ungenügende Mengen Knochenmark erhalten hatten, zeigten stärkere Durchfälle und stärkeres Erbrechen, besonders auffallend waren jedoch die Schleimhautveränderungen des Maules und die hämorrhagische Diathese. Hautveränderungen waren in beiden Gruppen gleich. Somit wird das akute, gastrointestinale Syndrom von der Qualität des Transplantats beeinflußt, wobei der Einfluß auf die Schleimhautveränderungen des Maules besonders groß ist. Die Veränderungen der Darmschleimhaut waren bei Hunden, die innerhalb der ersten beiden Tage nach KMT gestorben waren, besonders ausgeprägt, bei solchen, die gegen Ende der ersten Woche starben, geringer. Bei den früher gestorbenen Hunden überwiegt vermutlich der Verlust an Wasser, Elektrolyten und Albumin als Todesursache, bei den etwas später gestorbenen Hunden die Infektion mit Darmkeimen, die durch Schädigung der Barriere in das Blut gelangen.

Die *hämopoetische Erholung* nach Infusion unterschiedlicher Knochenmarkmengen wurde bei Hunden untersucht, die mit 2400 R innerhalb von 7 Tagen bestrahlt waren. Die erfolgreiche Rekonstitution wurde angenommen, wenn eine vollständige Erholung mit Repopulation des Knochenmarks, Anstieg der Leukozyten und Thrombozyten im Blut festgestellt werden konnte. Sichere Anzeichen für eine Repopulation des Knochenmarks bestanden, wenn die Zellularität im Knochenmark 10 % oder mehr der Norm erreicht hatte, wenn Leukozyten auf 350/mm^3 oder mehr und Thrombozyten auf 40 000/mm^3 oder mehr angestiegen waren. Neun Hunde hatten $\geqslant 5{,}8 \times 10^7$/kg KG mononukleäre KM-Zellen erhalten und überlebten mit vollständiger Erholung der Hämopoese. Fünfzehn Hunde hatten zwischen 1,5 und $5{,}2 \times 10^7$/kg mononukleäre KM-Zellen erhalten: 6 Hunde zeigten eine vollständige Erholung und überlebten nach verzögertem Anstieg der Blutwerte, 3 Hunde zeigten lediglich einen Anstieg der Leukozyten und starben mit hämorrhagischer Diathese und 6 Hunde starben ohne Anzeichen einer Rekonstitution der Homopoese. Acht Hunde, die zwischen 0,7 und $1{,}3 \times 10^7$/kg mononukleäre KM-Zellen erhalten hatten, starben ohne hämopoetische Erholung, bei einem Hund war ein sehr verspäteter Leukozytenanstieg, bei einem zweiten Hund eine geringe Repopulation des Knochenmarks zu beobachten. Höhere KM-Zellzahlen ermöglichten eine schnellere Erholung der Blutwerte, die geringste Menge Knochenmark, die zu einer vollständigen Erholung führte, betrug $1{,}5 \times 10^7$/kg KG. Nach Infusion von mehr als 1×10^8/kg KG mononukleäre KM-Zellen wurde die Erholung nicht weiter beschleunigt, diese Dosis kann als „optimale Dosis" gelten, da sie die geringste Menge darstellt, die zu frühest möglicher Erholung führt. Die Anzeichen hämopoetischer Rekonstitution in zwei Hunden, die weniger als $1{,}5 \times 10^7$/kg mononukleäre KM-Zellen erhalten hatten, weisen darauf hin, daß selbst solche geringen Mengen das Überleben ermöglichen dürften, wenn eine intensive supportive Therapie angewandt werden könnte. Der Gehalt an granulozytär-monozytär determinierten, hämopoetischen Stammzellen (CFU_c) wurde bei 18 Hunden bestimmt, die zum Überleben erforderliche Anzahl transplantierter CFU_c betrug 30 000/kg KG.

Elf Hunde hatten anstelle von Knochenmark durch wiederholte Leukapheresen gewonnene, *mononukleäre Blutzellen* bekommen. Sieben Hunde hatten zwischen 20 und 60 x 10^7/kg mononukleäre Blutzellen erhalten und starben ohne hämopoetische Erholung, zwei von 4 Hunden, die zwischen 70 und 120 x 10^7/kg erhalten hatten, überlebten mit vollständiger hämopoetischer Erholung. Vergleicht mant die Geschwindigkeit der Erholung von Leukozyten- und Thrombozytenwerten im Blut mit der von Hunden, die KM-Zellen erhalten hatten, so benötigt man die 20 - 50-fache Menge mononukleärer Blutzellen. Die Erholung der Lymphozytenwerte war jedoch schneller.

31 Hunde *überlebten* das akute Strahlensyndrom mit vollständiger hämopoetischer Rekonstitution. Zehn Hunde mußten leider wegen Platzmangels zwischen 5 und 21 Monten nach KMT getötet werden; zwei Hunde wurden wegen Krankheit getötet: ein Hund nach 2 Monaten wegen mononukleärer Myelomeningoencephalitis, ein Hund nach 5 Monaten wegen chronischen Hustens (Wurmpneumonie). Vier Hunde starben: ein Hund nach 2 Monaten mit akuter hämorrhagischer Pankreatitis, ein Hund nach 38 Monanten infolge übertragener Früchte, zwei Hunde nach 24 und 32 Monaten infolge einer Rauferei. 15 Hunde überleben zwischen 17 und 43 Monaten nach KMT. Bei Laparoskopie der überlebenden Hunde und Autopsie der gestorbenen Hunde wurde in der Hälfte der Fälle eine Pankreasdystrophie und -fibrose leichten bis mäßigen Grades gefunden, die jedoch nicht immer zu Gewichtsverlusten geführt hatten.

Die *Untersuchungen haben ergeben,* daß das akute Strahlensyndrom nach 2400 R GKB und autologer KMT beherrscht werden kann, wenn diese Dosis fraktioniert innerhalb von 5 bis 7 Tagen gegeben wird. Das akute, gastrointestinale Strahlensyndrom wird durch Transplantation geringer Mengen hämopoetischer Zellen verstärkt. Andererseits erfordert die höher dosierte GKB mit 2400 R keine erhöhte Menge hämopoetischer Zellen zur Rekonstitution der Hämopoese. Das bedeutet, daß das die Hämopoese unterstützende Knochenmarkstroma durch diese Bestrahlung nicht wesentlich geschädigt sein kann. Langfristige Beobachtungen haben bisher keine Spätschäden feststellen können, die der Anwendung der GKB mit 2400 R bei malignen Erkrankungen entgegenstünden.

Summary

Autologous bone marrow transplantation (BMT), i.e. reinfusion of own bone marrow after total body irradiation, allows irradiation with otherwise fatal radiation doses. It facilitates the treatment of generalized malignancies by total body irradiation (TBI). Presently used TBI which consists of a single dose of 1200 R-in air (approx. 10 Gy) has not been sufficient for controling hematologic malignancies of man nor of dog. Therefore autologous BMT after higher radiation doses was investigated in dogs.

The *acute radiation syndrome* after a single dose of 1600 R (approx. 12 - 14 Gy in body midline) and after fractionated irradiation with 2400 R (approx. 18 - 20 Gy) was studied with regard to fractionation time and to the number of bone marrow cells infused. The acute radiation syndrome consisted of damage to the alimentary tract with vomitus and diarrhea and of damage to the hemopoietic system with aplasia of the bone marrow and pancytopenia in the peripheral blood. Damage of hemopoiesis was reversible in dogs which had been given a sufficient amount of hemopoietic cells. Furthermore changes in skin with radiation erythema and scaling and in the mucous membranes with greyish debris and ulceration in the mouth, inflammation of nose and conjunctivae. The single dose of 1600 R was applied at a dose rate of 5,5 R/min, immediately after irradiation dogs received their fresh bone marrow in sufficient amounts (10,3 - 34,0 x 10^7/kg mononuclear cells) which had been obtained prior to TBI. Fractionated irradiation with 2400 R was given in a fraction of 1200 R within 24 hours before BMT and two additional fractions of 600 R either on the second and third day before BMT or the third and fifth day or the fourth and seventh day. The dose of 1200 R has been used as a standard dose which produces only a mild and reversible gastrointestinal syndrome. This dose was applied at a dose rate of 5,5 R/min. The dose 600 R is fatal in dogs because of irreversible bone marrow insuffciency without producing a gastrointestinal syndrome of clinically detectable severity. Fractions of 600 R were given at a dose rate of 0,5 R/min in the 7 day regimen and in some dogs treated with the 5 day regimen, the remaining dogs being treated with a dose rate of 5,5 R/min. In these dogs bone marrow had been obtained between 2 and 14 weeks before BMT and had been stored in the frozen state (-140°C). Dogs which had been irradiated with a single dose of 1600 R survived, periods of leukocytopenia and thrombocytopenia were short. Vomitus and diarrhea were observed in all dogs at the end of the first and the begin of the second week, changes in mucous membranes were absent. Fractionated irradiation with 2400 R within 3 days produces severe vomitus, watery stools with blood contamination and exsiccosis. Only one of 4 dogs survived. The same dose given within 5 days produced an acute radiation syndrome of a limited extent, seven of 8 dogs survived. The radiation syndrom was not different whether 600 R fractions were given with a dose rate of 5,5 R/min or 0,5 R/min. 2400 R within 7 days led to vomitus and diarrhea of mild or moderate degree, but leukocytopenia and thrombocytopenia were prolonged and associated

with pronounced mucositis of the mouth. The dogs survived. Dogs which had been irradiated with 2400 R within 7 days and had received less bone marrow developed more severe diarrhea and vomitus. In these dogs mucositis was particularly severe. Radiation erythema was comparable in both groups. It can be concluded that the gastrointestinal syndrome and particularly the mucositis of the mouth is influenced by the quality of the graft. The changes in the gut epithelium were pronounced in dogs that died within the first days of BMT, they were less pronounced in dogs that die versus the end of the first week. Presumably, the loss of body water, electrolytes and albumin contributes more to these early deaths whereas infections due to invasion of bacteria of the gastrointestinal flora contribute more to the later deaths.

Hemopoietic recovery following infusion of various amounts of bone marrow was investigated in dogs which were irradiated with 2400 R within 7 days. Repopulation of bone marrow as well as rise of leukocyte and platelet counts in the peripheral blood was taken as evidence of complete hemopoietic reconstitution. Signs of hemopoietic reconstitution were unequivocal, if cellularity of bone marrow reached 10 per cent or more of normal cellularity, leukocytes rose to 350/mm^3 or more and platelets to 40 000/mm^3 or more in the peripheral blood. Nine dogs had received $\geqslant$ 5,8 x 10^7/kg mononuclear bone marrow cells and survived with complete recovery of hemopoiesis. Fifteen dogs had received between 1,5 and 5,2 x 10^7/kg mononuclear marrow cells: 6 dogs developed complete reconstitution and survived following the retarded rise of blood counts, 3 dogs experienced only a rise of leukocytes and died without signs of reconstitution of hemopoiesis. Eight dogs which had been given between 0,7 and 1,3 x 10^7/kg mononuclear marrow cells died without hemopoietic recovery. One dog had developed a very late rise of leukocytes, a second dog showed some restoration of marrow cellularity. Greater numbers of marrow cells led to earlier restoration of blood counts, the minimal amount of marrow leading to complete recovery was 1,5 x 10^7/kg. More than 1 x 10^8/kg mononuclear marrow cells did not further accelerate hemopoietic recovery. This dose represents an "optimal dose", since it is the minimal dose leading to the earliest possible restoration. On the other hand, signs of hemopoietic restoration in two dogs given less than 1,5 x 10^7/kg mononuclear marrow cells indicate that even this small amount may be sufficient, if intensive supportive therapy could be given. The content of hemopoietic stem cells determined for granulo- and monocytopoiesis (CFU_c) was evaluated in 18 dogs. The minimal amount required for survival was 30 000/kg.

Eleven dogs had received *mononuclear blood cells* instead of bone marrow cells which had been obtained by repeated leukapheresis. Seven dogs were given between 20 and 60 x 10^7/kg mononuclear blood cells and died without hemopoietic recovery, two out of four dogs which had received between 70 and 120 x 10^7/kg survived with complete hemopoietic reconstitution. The kinetic of recovery of leukocyte and platelet values in blood indicated that the 20 to 50fold the amount of blood leukocytes is required as compared to bone marrow. However, restoration of lymphocyte counts was faster in dogs given blood cells.

31 dogs *survived* the acute radiation syndrome with complete hemopoietic reconstitution. Ten dogs had to be killed because of lack of kennel space, two dogs because of suspected disease. One of these killed after two month had mononuclear myelomeningoencephalitis, the other was killed after 5 months because of chronic cough (worm infection of the lung). Four dogs died: one dog after two months of acute hemorrhagic pancreatitis, one dog after 38 months with passed over-parturition, two dogs after 24 and 32 months in dog fights. 15 dogs survive between 17 and 43 months after BMT. At laparoscopy of survivors and autopsy dystrophy and fibrosis of pancreas of mild to moderate degree was observed in half of the animals. The pancreatic changes could not be correlated with weight loss.

The *results indicate* that the acute radiation syndrom following 2400 R TBI and autologous BMT can be controlled by fractionation of this dose within 5 or 7 days. The acute gastrointestinal syndrome is aggravated by infusion of a lesser amount of hemopoietic cells. However, TBI with 2400 R does not require greater numbers of hemopoietic cells for restoration of hemopoiesis. Thus, the hemopoiesis supporting tissue can not be damage by this radiation dose to an essential degree. Longterm observations have not revealed serious late defects which could represent a contraindication to the treatment of malignent diseases with 2400 R of TBI.

7. Literaturverzeichnis

ALPEN, E.L.; BAUM, S.J. (1958): Modification of x - irradiation lethality by autologous marrow infusion in dogs; Blood 13, 1168 - 1175

ALPER, T.; GILLIES, N.E.; ELKIND, M.M. (1960): The sigmoid survival curve in radiobiology; Nature 186, 1062 - 1063

ALPER, T.; HOWARD, A.; KIEFER, J. (1969): Radiobiological terminology; Nature 224, 625 - 626

APPELBAUM, F.R.; HERZIG, G.P.; GRAW, R.G.; BULL, M.J.; BOWLES, C.; GORIN, N.C.; DEISSEROTH, A.B. (1978): Study of cell dose and storage time on engraftment of cryopreserved autologues bone marrow in a canine model; Transplantation Vol. 26 - No. 4, 245 - 248

APPELBAUM, F.R. (1979): Hemopoietic reconstitution following autologous bone marrow and peripheral blood mononuclear cell infusions; Exp. Hematol. Vol. 7 - Suppl. No. 5, 7 - 11

ASHWOOD-SMITH, M.J. (1961): Preservation of mouse bone marrow at -79°C with dimethyl-sulphoxide; Nature 190, 1204 - 1205

BARNES, D.H.W.; LOUTIT, J.F. (1955): The radiation recovery factor: preservation by the Polge-Smith-Parkes technique; J. Nat. Cancer Inst. 15, 901 - 905

BARR, R.D.; WHANG-PENG, J. (1975): Hemopoietic stem cells in human peripheral blood; Science 90, 284 - 285

BECKER, A.J.; McCULLOCH, E.A.; TILL, J.E. (1963): Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies from transplantated mouse marrow cells; Nature 197, 452 - 454

BEGEMANN, H.; HARWERTH, H.G. (1977): Methodik - peripheres Blutbild; in: „Praktische Hämatologie", 371 - 386; Hrsg.: dto.; Georg Thieme Verlag – Stuttgart

BERGE, E.; WESTHUES, M. (1969): Die Unterbindung der Arteria carotis communis; in: „Tierärztliche Operationslehre", Kapitel F., 181 - 182; Hrsg.: dto.; Paul Parey Verlag – Berlin/Hamburg

BIERMANN, H.R.; KELLY, K.H.; BYRON, R.L.; MARSHALL, G.J. (1961): Leucapheresis in man: I. Haematological observations following leucocyte withdrawal in patients with non-haematological disorders; Br. J. Haematol. 7, 51 - 63

BOND, V.P.; FLIEDNER, T.M.; ARCHAMBEAU, J.O. (1965): The radiation syndromes; in: „Mammalian radiation lethality" Chapter 5, 101 - 114; Ed.: dto.; Academic Press – New York/London

BRADLEY, T.R.; METCALF, D. (1966): The growth of mouse bone marrow cells in vitro; Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44, 287 - 300

BUCKNER, C.D.; STORB, R.; DILLINGHAM, L.A.; THOMAS, E.D. (1970): Low temperature preservation of monkey marrow in dimethyl-sulphoxide; Cryobiology 7, 136 - 140

CALVO, W.; FLIEDNER, T.M.: HERBST, E.W.; FACHE, I. (1975): Regeneration of blood – forming organs after autologous leukocyte transfusion in lethally irradiated dogs: I. Distribution and cellularity of the bone marrow in normal dogs; Blood Vol. 46 – No. 3, 453 - 457

CALVO, W.; FLIEDNER, T.M.; HERBST, E.; HÜGL, E.; BRUCH, C. (1976): Regeneration of blood-forming organs after autologous leukocyte transfusion in lethally irradiated dogs: II. Distribution and cellularity of marrow in irradiated and transfused animals; Blood Vol. 47 – No. 4, 593 - 601

CAVALLI-SFROZA, L. (1972): Mittelwerte und Variabilität; in: „Biometrie – Grundzüge biologisch-medizinischer Statistik" Kap. B, 31 - 53; Hrsg.: dto.; Gustav Fischer Verlag – Stuttgart

CAVINS, J.A.; KASURKA, S. THOMAS, E.D.; FERREBEE, J.W. (1962): Recovery of lethally irradiated dogs following infusion of autologous marrow stored at low temperature in dimethyl-sulphoxide, Blood Vol.20 - No. 6, 730 - 734

CAVINS, J.A.; SCHEER, S.C.; THOMAS, E.D.; FERREBEE, J.W. (1964): The recovery of lethally irradiated dogs given infusion of autologous leukocytes preserved at -80° C; Blood Vol. 23 – No. 1, 38 - 42

CHAMBERLIN, W.: BARONE, J.: KEDO, A.; FRIED, W. (1974): Lack of recovery of murine hematopoietic stromal cells after irradiation induced damage; Blood Vol. 44 - No. 3, 385 - 392

CHERTKOV, J.L.; SUKYASYAN, G.V.; NOVIKOVA, M.N.; NEMENOVA, N.M.; KOTLYAROV, A.M.; MALARINA, V.N.; SAMOYLINA, N.L.; UDALOV, G.A.; SEMENOV, L.F. (1971): Autologous bone marrow transplantation in irradiated baboons; Radiat. Res. 46, 129 - 143

COLE, L.J.; FISHLER, M.C.; BOND, V.P. (1953): Subcellular fractionation of mouse spleen radiation protection activity; Proc. Nat. Acad. Sci. 39, 759 - 772

CONGDON, C.C.; McKINLEY, T.W.; SUTTON, H.; URSO, P. (1956): The effect of transfusions of blood showing extreme leukocytosis on survival of x – irradiated mice; Radiat. Res. 4, 424 - 434

CRONKITE, E.P.; FLIEDNER, T.M. (1972): The radiation syndromes; in: „Handbuch der medizinischen Radiologie" II/3, 299 - 339; Hrsg.: Bauchinger, E.P.; Cronkite, E.P.; Fliedner, T.M. ; Springer Verlag – Berlin/Heidelberg/New York

DEBELAK - FEHIR, K.M.; CATCHATOURIAN, R.; EPSTEIN, R.B. (1975): Hemopoetic colony forming units in fresh and cryopreserved peripheral blood cells of canines and man; Exp. Hemat. 3, 109 - 116

DEXTER, T.M.; SPOONCER, E. (1980): Transplantation of cultured hemopoietic stem cells; in: „Immunobiology of bone marrow transplantation" 1, 11 - 18; Ed.: Thierfelder, S.; Rodt, H.; Kolb, H.J.; Springer Verlag – Heidelberg

DÜRR, U.M.; KRAFT, W. (1975): Hämatologie; in: „Kompendium der klinischen Laboratoriumsdiagnostik bei Hund, Katze, Pferd", 54 - 120; Hrsg.: dto.; Verlag M. und H. Schaper – Hannover

DUTREIX, J.; WAMBERSIE, A.; LOIRETTE, M.; BOISSERIE, G. (1979): Tissue factors in total body irradiation; Pathol. Biol. 27, 365 - 369

ELKIND, M.M.; SUTTON, H. (1960): Radiation response of mammalian colles grown in culture: I. Repair of x-ray damage in surviving chinese hamster cells; Radiat. Res. 13, 556 - 539

ELKIND, M.M.; SUTTON-GILBERT, H.; MOSES, W.B.; KAMPER, C. (1967): Sublethal and lethal radiation damage; Nature 214, 1088 - 1092

ELKIND, M.M. (1977): The initial part of the Survival curve. Implications for low dose, low-dose rate radiation responses; Radiat. Res. 71, 9 - 23

ELLIS, F. (1968): The relationship of biological effect to dose-time fractionation factors in radiotherapy, in: EBERT, HOWARD – „Current topics in radiation research" 4, 357 - 397; Amsterdam, North-Holland

FLIEDNER, T.M.; KÖRBLING, M.; CALVO, W.; BRUCH, C.; HERBST, E. (1977): Cryopreservation of blood mononuclear leucocytes and stem cells suspended in a large fluid volume; Blut 35, 195 - 202

FORD, C.E.; HAMERTON, J.L.; BARNES, D.H.W.; LOUTIT, J.F. (1956): Cytological identification of radiation chimaeras; Nature 177, 452 - 454

FRIEDENSTEIN, A.J.; GORSKAJA, U.F.; KULAGINA, N.N. (1976): Fibroblast precurcors in normal an irradiated mouse hematopoietic organs; Exp. Hemat. 4, 267 - 274

FU, K.K.; PHILLIPS, T.L.; KANE, L.J.; SMITH, B.S. (1975): Tumor and normal tissue response to irradiation in vivo: variation with decreasing dose rates; Radiology 114, 709 - 716

GERHARTZ, H.H.; FLIEDNER, T.M. (1980): Velocity sedimentation and cell cycle characteristics of granulopoietic progenitor cells (CFUc) in canine blood and bone marrow: influence of mobilization and CFUc-depletion; Exp. Hemat. 8, 209 - 218

GEYER, S.; BODENBERGER, U.; SCHÄFFER, E.; KOLB, H.J.; WILMANNS, W. (1981): Pankreasveränderung nach Ganzkörperbestrahlung und autologer Knochenmarktransplantation in Hunden; Manuskript in Vorbereitung

GOODMAN, J.W.; HODGSON, G.S. (1962): Evidence for stem cell in the peripheral blood of mice; Blood 19, 702 - 714

GORIN, N.C.; NAJMAN, A.N.; DUHAMEL, G. (1977): Autologous bone marrow transplantation in acute myelocytic leukemia; Lancet 1, 1050

GORIN, N.C.; HERZIG, G.; BULL, M.J.; GRAW, R.G. (1978): Long term preservation of bone marrow and stemm pool in dogs; Blood 2, 257 - 265

HAGER, E.B.; MANNICK, J.A.; THOMAS, E.D.; FERREBEE, J.W. (1961): Dogs that survive „lethal" exposures to radiation; Radiat. Res. 14, 192 - 205

HAGER, E.B.; FERREBEE, J.W.; THOMAS, E.D. (1963): Damage and repair of the gastrointestinal tract after supralethal radiation; Radiobiologica – Radiotherapia Band 4 – Heft 1, 1 - 11

HANDFORD, S.W. (1960): The acute radiation syndrome in dogs after total-body exposure to a supralethal dose of ionizing radiation: Radiat Res. 13, 712 - 725

HEINECKE, H. (1903): Über die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf Tiere; Münch. Med. Wschr. 48, 2090 - 2092

HERBST, E.W.; FLIEDNER, T.M; CALVO, W.; SCHNAPPAUF, H.; MEYER H. (1975): Untersuchungen über die Gewinnung hämopoetischer Stammzellen aus dem peripheren Blut von Hunden und über ihre Fähigkeit, die Blutzellbildung zu regenerieren; Blut Band 30 – Heft 6, 265 - 276

HUG, O.; KELLERER, A.; ZUPPINGER, A. (1966): Der Zeitfaktor; in: „Handbuch der medizinischen Radiologie" II/1, 271 - 354; Hrsg.: Alexander, T.; Dahle, W.D.; Springer Verlag – Berlin/Heidelberg/New York

JACOBSON, L.O.; MARKS, E.K.; ROBSON, M.J.; GASTON, E.D.; ZIRKLE, R.E. (1949): The effect of spleen protection on mortality following x-irradiation; J. Lab. Clin. Med. 34, 1538 - 1543

JACOBSON, L.O.; SIMMONS, E.L.; MARKS, E.R.; ELDREDGE, J.H. (1951): Recovery from radiation injury; Science 113, 510 - 511

KNOSPE, W.H.; BLOM, J.; CROSBY, W.H. (1966): Regeneration of locally irradiated bone marrow: I. Dose-dependent, long-term changes in the rat with particular emphasis upon vascular and stromal reaction; Blood 28, 398 - 415

KOLB, H.; SALE, G.E.; LERNER, K.G.; STORB, R.; THOMAS, E.D. (1979a): Pathology of acute graft-versus-host disease in the dog; Am. J. Pathol. 96, 581 - 594

KOLB, H.J.; STORB, R.; WEIDEN, P.L.; OCHS, H.D.; KOLB, H.; GRAHAM, T.C.; FLOERSHEIM, G.L.; THOMAS, E.D. (1974): Immunologic,toxicologic and marrow transplantation studies in dogs given Dimethylmyleran; Biomedicine 20, 341 - 352

KOLB, H.J.; RIEDER, I.; BÖDENBERGER, U.; NETZEL, B.; SCHÄFFER, E.; KOLB, H.; THIERFELDER, S. AND THE MUNICH COOPERATIVE GROUP OF BONE MARROW TRANSPLANTATION (1979b): Dose rate and dose fractionation studies in total body irradiation of dogs; Path. Biol. 27, 370 - 372

KOLB, H.J.; BODENBERGER, U.; BÖNING, L., SAUER, H.; WILMANNS, W. (1981): Stem stell deficiency following treatment with adriamycin as detected by autologous bone marrow transplantation; Manuskript in Vorbereitung

LAMPERT, F. (1977): Kooperative Therapiestudie der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Leukämieforschung und -behandlung im Kindesalter e.V. unter Beteiligung von 35 Kinderkliniken – Combination chemotherapy and cranial irradiation in 530 children with acute lymphoblastic leukemia; Dtsch.Med. Wschr. 102, 917 - 921

LINDSLEY, D.L.; ODELL, T.T.; TAUSCHE, F.G. (1955): Implantation of fuctional erythropoietic elements following total-body irradiation; Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 90, 512 - 515

LORENZ, E.; CONGDON, C.C.; UPHOFF, D. (1952): Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections; Radiology 58, 863 - 877

MANNICK, J.A.; LOCHTE, H.L.; THOMAS, E.D.; FERREBEE, J.W. (1960a): In vitro and in vivo assessment of the viability of dog marrow after storage; Blood 15, 517 - 524

MANNICK, J.A.; LOCHTE, H.L.; ASHLEY, C.A.; THOMAS, E.D.; FERREBEE, J.W. (1960b): Autografts of bone marrow in dogs after lethal total-body radiation; Blood 15, 255 - 266

MAXIMOW, A. (1909): Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfötalen Leben der Säugetiere; Folia Haematol. (Leipzig) 8, 125 - 134

MELANIN, T.I.; PEGG, D.E.; PERRY, V.P.; BRODINE, C.E. (1970): Long term storage of bone marrow cells at liquid nitrogen and dry ice temperatures; Cryobiology 7, 65

METCALF, D.; McDONALD, H.R.; ODARTCHENKO, N.; SORDAT, B. (1975): Growth of mouse megacaryocyte colonies in vitro; Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 1744

MICKLEM, H.S.; ANDERSON, N.; ROSS, E. (1975): Limited potential of circulating haemopoietic stem cells; Nature 256, 41 - 43

NACCHIERO, M.; ADLER, M.; PIERONI, P.L.; TAKESHIMA, T.; RUDICK, J.; DREILING, D.A. (1978): The parotid and the pancreas; American Journal of Gastroenterology 70, 151 - 157

NETZEL, B.; HAAS, R.J.; RODT, H.; KOLB, H.J.; THIERFELDER, S. (1980): Immunological conditioning of bone marrow for autotransplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia; Lancet 1, 1330 - 1332

NOTHDURFT, W.; BRUCH, C.; FLIEDNER, T.M. (1977): Studies on the regeneration of the CFUc population in blood and bone marrow of lethally irradiated dogs after autologous transfusion of cryopreserved mononuclear blood cells; Scand. J. Haematol. 19, 470 - 481

NOWELL, P.C.; COLE, L.J.; HABERMEYER, J.G.; ROAN, P.L. (1956): Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice; Cancer Res. 16, 258 - 261

O'GRADY, L.F.; LEWIS, J.P. (1972): The long term preservation of bone marrow; Transfusion 12, 312

PHAN, T.T.; BENDER, M.A.; CHUAN, C.Y.; HOI, B. (1963): Durée de conservation de la moëlle osseuse congelée de souris; Rev. Fr. Etud. Clin. Biol. 8, 589

PIKE, B.L.; ROBINSON, W.A. (1970): Human bone marrow colony growth in agar-gel; J. Cell. Physiol. 76, 77 - 84

PLUZNIK, D.H.; SACHS, L. (1965): The cloning of normal „mast" cells in tissue culture; J. Cell. Physiol. 66, 319 - 324

PORTER, K.A.; MURRAY, J.E. (1958): Successful homotransplantation of rabbit bone marrow after preservation in glycerol at -70° C; Cancer Res. 18, 117 - 119

PUCK, T.T.; MARCUS, P.J. (1956): Action of x-rays on mammalian cells; J. Exp. Med. 103, 653 - 666

QUASTLER, H. (1956): The nature of intestinal radiation death; Radiat. Res. 4, 303 - 320

RAGAB, A.H.; GILKERSON, E.; CHUI, S.C. (1974): The cryopreservation of colony forming cells from the bone marrow of children with acute lymphocytic leukemia; Cancer Res. 34, 942

REYNIERS, J.A.; TREXLER, P.C.; SCRUGG, S. (1956): Observations on germfree and conventional albino rats after total-body x-irradiation; Radiat. Res. 5, 591

RIEDER, I.; KOLB, H.J.; SCHÄFFER, E.; KOLB, H.; GROSSE-WILDE, H.; SCHOLZ, S.; THIERFELDER, S. (1978): Leukocyte transfusions for the modification of host-versus-graft reaction in dogs; aus: „Exp. Hemathol. Today" 11, 101 - 107; Ed.: Baum, S.J.; Ledney, G.D.; Springer Verlag – Berlin/Heidelberg/New York

ROSS, W.M.; KÖRBLING, M.; NOTHDURFT, W.; CALVO, W.; FLIEDNER, T.M. (1976): Characterization of bone marrow and lymph node repopulating cells by transplanting mononuclear cells into radiated dogs; in: „Exp. Hemathol. Today" 29 - 38; Ed.; Baum, S.J.; Ledney, G.D.; Springer Verlag – Berlin/Heidelberg/New York

RUBIN, P.; CASSARETT, G. (1972): A direction for clinical radiation pathology. The tolerance dose; Front. Radiation Ther. Onc. 6, 1 - 16; Karger, Basel und University Park Press, Baltimore

SCHAEFER, U.W.; SCHMIDT, C.G. (1975): Konservierung von hämopoetischen Stammzellen; Z. Krebsforsch. 83, 285 - 291

SCHWARTZ, I.R.; KEPPLINGER, E.F.; CONGDON, C.C.; TOCANTINS, M.M. (1957): Transplantation of bone marrow after preservation at -70° C; J. Appl. Physiol. Vol. 11 – No. 1, 22 - 24

SHIVELY, J.N.; MICHAELSON, S.M.; HOWLAND, J.W. (1958): The response of dogs to bilateral whole-body Co^{60} irradiation : I. Lethal dose determination; Radiat. Res. 9, 445 - 450

SHIVELY, J.N.; MICHAELSON, S.M.; HOWLAND, J.W. (1961): The response of dogs to bilateral whole-body Co^{60} irradiation: II. Pathophysiological manifestations; Radiat Res. 15, 319 - 328

SLANINA, J.; MUSSHOFF, K. RAHNER, T.H.; STASNY, R. (1977): Longterm side effects in irradiated patients with Hodgkin's disease; Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2, 1 - 19

SPITZER, G.; DICKE, K.A.; LITAM, J.; VERMA, D.S.; ZANDER, A.; LANZOTTI, V.; VALDIVIESO, M.; McCREDIE, K.B.; SAMUELS, M.L. (1980): High dose combination chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in adult solid tumors; Cancer 45, 3075 - 3085

STEPHENSON, J.R.; AXELRAD, A.A.; McLEOD, D.L.; SHREEVE, M.M. (1971): Induction of colonies of hemoglobin synthesizing cells by erythropoietin in vitro; Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 68, 1542 - 1546

STORB, R.; EPSTEIN, R.B.; THOMAS, E.D. (1968): Marrow repopulating ability of peripheral blood cells compared to thoracic duct cells; Blood Vol. 32 - No. 4, 662 - 667

STORB, R.; RUDOLPH, R.H.; KOLB, H.J.; GRAHAM, T.C.; MICKELSON, E.; ERICKSON, V.; LERNER, K.G.; KOLB, H.; THOMAS, E.D. (1973): Marrow grafts between DLA-matched canine littermates; Transplantation 15, 92 - 100

SULLIVAN, R.D.; STECHER, G.; STERNBERG, S.S. (1959): Value of bone marrow and spleen cell suspensions for survival of lethally irradiated dogs; J. Nat. Cancer Inst. 23, 367 - 383

SYKES, M.P.; CHU, F.; GEE, T.S.; McKENZIE, S. (1974): Follow up of long-term effects of therapeutic irradiation on bone marrow; Radiology 113, 179 - 180

TAVASSOLI, M. (1975): Studies on hemopoietic microenvironments. Report of a workshop held in La Jolla, California, August 8 - 9, 1974; Exp. Hematol. 3, 213 - 226

THIERFELDER, S. (1975): Experimental bone marrow transplantation; Blut Band 30 – Heft 1, 1 - 18

THIERFELDER, S.; RODT, H.; NETZEL, B. (1977): Transplantation of syngenlic bone marrow incubated with leukocyte antibodies. I. Suppression of lymphatic leukemia of syngenlic donor mice; Transplantation 23, 459

THOMAS, E.D.; FERREBEE, J. W. (1962):Prolonged storage of marrow and its use in treatment of radiation injury; Transfusion 2, 115 - 117

THOMAS, E.D.; LeBLOND, R.; GRAHAM, T.; STORB, R. (1970a): Marrow infusions in dogs given midlethal or lethal irradiation; Radiat. Res. 41, 113 -124

THOMAS, E.D.; STORB, R. (1970b): Technique for human marrow grafting; Blood Vol. 36 - No. 4, 507 - 515

THOMAS, E.D.; STORB, R.; CLIFF, R.A., FEFER, A.; JOHNSON, L.F.; NEIMAN, P.E.; LERNER, K.G.; GLUCKSBERG, H.; BUCKNER, C.D. (1975): Bone marrow transplantation; N. Engl. J. Med. 252, 832 - 843

THOMAS, E.D.; BUCKNER, C.D.; BANAIJ, M.; CLIFT, R.A.; FEFER, A.; FLOURNOY, N.; GOODELL, B.W.; HICKMAN, R.O.; LERNER, K.G.; NEIMAN, P.E.; SALE, G.E.; SANDERS, J.E.; SINGER J.; STEVENS, M.; STORB, R.; WEIDEN, P.L. (1977): One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation and allogenic marrow transplantation; Blood 49, 511 - 533

TILL, J.E.; McCULLOCH, E.A. (1961): A direct measurement of the radiation sensivitiy of normal mouse bone marrow cells; Radiat. Res. 14, 213 - 222

VAN BEKKUM, D.W.; DE VRIES, M.J. (1967): The production of radiation chimaeras and the „stability of the chimaeric state; in: „Radiation chimaeras", Chapt. 2, 30 - 32, Ed.: dto.; Logos-Press – London und Academic Press – New York

VAN DER HAM, A.C.; BENNER, R.: VOS, O. (1977): Mobilization of B and T lymphocytes and haematopoietic stem cells by polymethacryle acid and dextran sulphate; Cell tissue Kinet. 10, 387 - 397

VAN LIEVEN, H.; HEINZE, H.G.; LAMPERT, F. (1976): „Prophylaktische" Hirnschädelbestrahlung bei der akuten Lymphoblastenleukämie im Kindesalter; Strahlentherapie 151, 3 - 9

VAN NOORD, M.J.; DICKE, K.A.; BLANSJAAR, N. (1972): Visualization of haemopoietic cells; Annual Report of Radiobiological Institute TNO/Rijswijk, 156 - 158

VRIESENDORP, H.M.: VISSER, T.P.; VAN KESSEL, A.C.M. (1976): Cryopreservation studies in dog bone marrow cells: Annual Report of Radiobiological Institute TNO/Rijswijk, 208 - 210

VRIESENDORP, H.M.; VAN BEKKUM, D.W. (1980): Role of total body irradiation in conditioning for bone marrow transplantation; in „Immunobiology of bone marrow transplantation", 349 - 363; Ed.: Thierfelder, S. Rodt, H.; Kolb, H.H.; Springer Verlag – Heidelberg

VULINEC, M. (1978): Neues über die Diagnostik der exokrinen Pankreasinsuffizienz bei Karnivoren; Praxis veterinaria 26, 33 - 40

WEIDEN, P.L.; ROBINETT, B.; GRAHAM, T.C.; ADAMSON, J.; STORB, R. (1974): Canine cyclic neutropenia – a stem cell defect; J. Clin. Invest. 53, 950 - 953

WEIDEN, P.L.; STORB, R.; LERNER, K.G.; KAO, G.F.; GRAHAM, T.C.; THOMAS, E.D. (1975): Treatment of canine malignancies by 1200 R total body irradiation und autologous marrow grafts, Exp. Hematol. 3, 124 - 134

WEIDEN, P.L.; STORB, R.; DEEG, H.J.: GRAHAM, T.C.; THOMAS, E.D. (1979): Prolonged disease-free survival in dogs with lymphoma after total-body irradiation und autologous marrow transplantation consolidation of combination-chemotherapy-induced remission; Blood Vol. 54 - No. 5, 1039 - 1049

WEINER, R.S.; TOBIAS, J.S.; YANKEE, R.A. (1976): The processing of human bone marrow for cryopreservation and reinfusion; Biomedicine 24, 226 - 231

WILSON, F.D.; STITZEL, K.A.; KLEIN, A.K.; SHIFRINE, M.; GRAHAM, K.; JONES, K.; BRADLEY, E.; ROSENBLATT, L.S. (1978): Quantitave response of bone marrow colony-forming units (CFUc and PFUc) in weanling beagles exposed to acute whole-body gamma irradiation; Radiat. Res. 74, 289 - 297

WILSON, J.D.; DALTON, G. (1976): Human T-lymphcyte colonies in agar: a comparison with other T-cell assays in healthy subject and cancer patients; Aus. J. Exp. Biol. Med. Sci. 54, 27

WITHERS, H.R.; OLIVER, G.D.; GLENN, D.W. (1971): Response of mouse jejunal crypt cells to low dose rate irradiation with californium neutrons or radium gamma-rays; Radiat. Res. 48, 484 - 494

WITHERS, H.R. (1975): The four R's of radiotherapy; Adv. Radiat. Biol. 5, 241 - 271

WOLF, N.S.; TRENTIN, J.J. (1968): Hemopoietic colony studies: 5. Effect of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cells; J. Exp. Med. 127, 205

ZANDER, A.; SPITZER, G.; VERMA, D.S.; BERAN, M.; DICKE, K.A. (1980): Effect of pyran copolymer on murine hemopoiesis; Exp. Hemat. 8, 521 - 526

Für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten danke ich Herrn Prof. Dr. K. Tempel, Herrn Prof. Dr. S. Thierfelder und Herrn Prof. Dr. W. Wilmanns.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H.J. Kolb, Frau Dr. I. Rieder und Herrn Dr. B. Netzel für ihre Unterstützung und den jederzeit gewährten Rat.

Fräulein A. Arco-Zinneberg, Frau H. Kurr und Frau B. Obermeier danke ich für die gewissenhafte und qualifizierte Assistenz.

Den Tierpflegern Frau T. Widmann, Herrn H. Wittmann, Fräulein S. Hörl und Herrn H. Janod gilt mein Dank für ihre vorbildliche Betreuung der Versuchstiere.

Lebenslauf

08.11.46	Geboren in Leverkusen als viertes Kind des Oberst i.G. a.D. Wolf Bodenberger und der Hausfrau Ruth Bodenberger, geb. Oestermann
53 - 57	Volksschulbesuch in Leverkusen und Bremen
57 - 66	Besuch von mathematisch-naturwissenschaftlichen Gymnasien in Bremen, Bonn-Bad Godesberg und Fürstenfeldbruck
19.07.66	Abitur
66 - 69	Bundeswehr/Heer: Pionier in Speyer, Bogen/Do., München und Ingolstadt
27.10.69	Leutnant
70 - 72	Vorklinisches Studium der Veterinärmedizin an der FU Berlin
73 - 76	Klinisches Studium der Veterinärmedizin an der LMU München und Werkstudent beim Sonderforschungsbereich 37 der LMU im Institut für Hämatologie/Abtlg. Immunologie der GSF in Neuherberg
24.11.76	Approbation
77 - 78	Doktorarbeit / exp. Teil und wissenschaftliche Mitarbeit im o.g. Institut
seit 79	Wissenschaftlicher Angestellter im SFB 37 / Projekt E 4 - E 8 und im Institut für Hämatologie / Abtlg. Klinische Hämatologie der GSF

Am 13. Mai 1977 Eheschließung mit Dr. Barbara Bodenberger, geb. Roesinger. Wir haben einen Sohn im Alter von 8 Monaten, Stephen.

Dachau, den 3. Januar 1981

Ulrich Bodenberger